Cytogenetical studies on *Oryza sativa* L.
IV. The cytogenetics of F_1 hybrid of *O. sativa* L. and *O. minuta* PRESL.[1]

By Toshitaro MORINAGA

With 29 text-figures and 4 tables

(Received March 29, 1940)

By the botanic-morphological and botanic-geographical methods, ROSCHEVICZ (11) has established 4 sections within the genus *Oryza*, namely, Section Oryza ROCHEV., Section Granulata ROCHEV., Section Coactata ROCHEV. and Section Rhynchoryza ROCHEV. He described 19 species altogether: 12 species under Section Oryza, 2 species under Section Granulata, 4 species under Section Coactata and 1 species under Section Rhynchoryza. In conclusion he says, "by far not all cultivated rices have originated from *O. sativa* L. f. *spontanea;* many of them have their origin from species akin to *O. sativa* L. as *O. breviligulata* A. CHEVAL. et ROEHR., *O. glaberrima* STEUD., *O. minuta* PRESL., *O. officinalis* WALL., etc. either by way of being introduced into cultivation along with *O. sativa* L., or by way of hybridization with the latter". As the cytological knowledge on *Oryza* was so rudimentary by that time, that we knew nothing but the chromosome number of one species *O. sativa* L. (3), ROSCHEVICZ could not obtain any suggestion in that field. Since then, the chromosome number has been determined for 5 other species: 3 species, *O. latifolia* DESV., 2n=48, *O. cubensis* EKMAN, 2n=24, and *O. formosana* MASAMUNE et SUZUKI, 2n=24 by GOTOH and OKURA (1), 1 species, *O. minuta* PRESL., 2n=48 by MORINAGA (4), and 1 species, *O. officinalis* WALL., 2n=24 by NANDI (8). *O. cubensis* EKMAN and *O. formosana* MASAMUNE et SUZUKI are the species which very closely resemble *O. sativa* L., and they may be of that species itself. Three other species belong, together with *O. sativa* L., to Section Oryza ROCHEV. Recent cytological studies on *Oryza* have been carried on along three main lines; 1. studies of chromosome morphology (including its relation to nucleolus) and affinity (primary, secondary and irregular) chiefly on *O. sativa* L.; 2. studies of haploid and autopolyploids of *O. sativa* L.; 3. cytogenetics of interspecific hybrids in *Oryza*. With a review of those studies,

(1) Contributions from the Institute of Agronomy, Kyushu Imperial University, No. 61.

ROSCHEVICZ's conclusion above mentioned should be criticized fully some day in a new light.

Since 1934, the author has been engaged in cytogenetical studies on the interspecific hybrids of *Oryza*. Though the chief aim of the investigations was to know the genomic relationships existing among those species, attention was also paid to finding a clue to explain the intraspecific differentiation of *O. sativa* L. A preliminary report on the cytological side of those studies was given in 1937 (5), and that on the side of breeding was made in the following year (6). The author's opinion on the genomic constitution of some of those species was also reported in 1939 (7).

In the present paper, the results of investigations of one of those interspecific hybrids, *O. sativa* L.×*O. minuta* PRESL., will be presented in a rather complete form.

Results of breeding experiments

Materials and Methods

O. minuta PRESL., 2n=48. The seeds of this species were kindly provided, in 1933, by Prof. B. M. GONZALEZ of the University of the Philippines. The species is, as compared with common varieties of *O.*



Fig. 1. *O. minuta* PRESL.

sativa L., lower in height, having slender and procumbent stems with tender leaves. Its panicles are of the spreading type and produce small and strongly deciduous spikelets (Fig. 1).

O. sativa L., 2n=24. To cover all types of the species, 43 varieties from various parts of the world were chosen for the cross experiments. Of those 43 varieties, 15 were of Japan proper (8 normal varieties and 7 mutant types), 2 of Corea and 1 of Formosa. Ten varieties came from China, 2 from India, 1 from Ceylon and 12 from several parts of U.S.S.R. All Japanese varieties treated belong to *O. sativa* L. subsp. *Japonica* KATO, while others, excepting a few uncertain Russian kinds, no doubt belong to *O. sativa* L. subsp. *Indica* KATO (2).

Artificial crossings were performed in a moist crossing house by the common clipping method.

Results of crossing

In 1934, artificial hybridization was tried reciprocally between *O. sativa* L. and *O. minuta* PRESL. Taking *minuta* on the maternal side, 15 varieties of *sativa* were mated. The number of flowers pollinated was in total 374, and none of them produced well developed grains. In 45 spikelets, the ovaries developed more or less, but they may have been nothing but parthenocarpic. On the other hand, 31 varieties of *sativa* were chosen on the maternal side and 1502 flowers altogether were pollinated with the pollen-grains of *minuta*. Thirteen spikelets (0.84%) produced perfect grains, and 160 (10.65%) produced grains ill developed to various degrees. Some of those may have been merely parthenocarpic. In May 1935, all grains obtained were put on a germination bed in Petri-dishes, and germination took place scatteringly in 3 to 14 days. Ten perfect grains out of the 13 germinated normally, and they grew up finally into just the same plants as the female parent, suggesting the occurrence of diploid parthenogenesis or more probably pollen contamination. No partially developed caryopses or ovaries produced on the *minuta* plants could germinate, and out of those 160 imperfect grains developed on the *sativa* plants, 143 also failed to germinate. Though the remaining 17 imperfect grains produced coleoptiles, they could not survive that stage with the exception of three which grew up as true F_1 plants. The three F_1 plants, thus obtained. were designated respectively as F_1-22 (Wase-aikoku × *minuta*), F_1-37 (Murasaki-moture × *minuta*) and F_1-42 (Murasaki-higeyori-kawari × *minuta*). As is shown in Table II, the germinable F_1 seeds were obtained, excepting one Russian kind, only with Japanese varieties viz. subsp. *Japonica,* though more flowers of subsp. *Indica* were pollinated with the pollen of *minuta.*

TABLE I. Results of artificial cross pollination, *O. minuta* PRESL. ♀ × *O. sativa* L. ♂, in 1934

Line No. of F_1 in 1935	Combination of parents	Origin of *sativa* variety	Number of flowers pollinated	Number of perfect grains obtained	Number of imperfect grains obtained	Number of sterile spikelets	Number of seeds germinated
—	*minuta* × Kamenoo	Japan proper	9	0	0	9	0
—	,, × Kihada-moti	,,	27	0	0	27	0
1–3	,, × Iwatekomurasaki-moti, No. 1	,,	46	0	10	36	0
—	,, × Sinano No. 1	,,	21	0	0	21	0
4	,, × Tataso	Corea	11	0	1	10	0
—	,, × Gesso	,,	10	0	0	10	0
5	,, × Taihakubô	China	11	0	4	7	0
6	,, × Heiroku-moti-isi, No. 1	Japan proper	26	0	6	20	0
7–8	,, × Dahanala	Ceylon	26	0	4	22	0
9–10	,, × Seiyu	Formosa	32	0	16	16	0
11	,, × Tisentô	China	62	0	1	61	0
12	,, × Russian No. 19	Russia	13	0	2	11	0
—	,, × ,, No. 29	,,	66	0	0	66	0
13	,, × ,, No. 35	,,	10	0	1	9	0
—	,, × ,, No. 48	,,	4	0	0	4	0
Total			374	0	45	329	0
% for the total flowers pollinated				0	12.3	87.97	

Description of F_1 plants

The F_1 plants were kept in a greenhouse until July, then they were brought out into a net-house, where the plants conceived the ear only at the end of October. Coming to the middle of November, they were again put into the greenhouse, where the ear shot out in about 20 days. In the next year, 3 clonal lines were obtained by division of those three F_1 plants. To assure the flowering on the outside, 3 individuals of each line were kept from August 6th under a controlled day length of 8 hours, the remaining ones being left under natural condition. The dates of flowering for those 3 kinds of F_1, namely, F_1-22, F_1-37 and F_1-42, were respectively Aug. 31st., Sept. 5th. and Sept. 2nd. under the reduced day

TABLE II. Results of artificial cross pollination, *O. sativa* L ♀ × *O. minuta* PRESL. ♂, in 1934

Line No. of F_1 in 1935	Combination of parents	Origin of *sativa* variety	Number of flowers pollinated	Number of perfect grains obtained	Number of imperfect grains obtained	Number of sterile spikelets	Number of grains germinated	Number of seedlings died soon after germination	Number of selfed individuals	Number of true F_1 plants survived
14–18	Kamenoo × minuta	Japan proper	132	0	13	119	0	0	0	0
19	Toyokuni-No. 71 × ,,	,,	50	0	9	41	1	1	0	0
20–21	Sinano-No. 1 × ,,	,,	115	0	2	113	0	0	0	0
22–23	Wase-aikoku-No. 30 × ,,	,,	37	0	9	28	1	0	0	1
24	Murasaki-daikoku × ,,	,,	15	0	11	4	7	7	0	0
25	Rikuu-No. 132 × ,,	,,	12	0	2	10	1	1	0	0
26–27	Sôzyuku-renkwahakukôtô × ,,	China	100	0	11	89	0	0	0	0
28–32	Sôzyuku-kôbôtenkôtô × ,,	,,	124	1	21	102	1	0	1	0
—	Tyôkokusyu × ,,	,,	9	0	0	9	0	0	0	0
33	Russian-No. 39 × ,,	Russia	116	0	1	115	1	1	0	0
—	Russian-No. 35 × ,,	,,	13	0	0	13	0	0	0	0
—	Russian-No. 59 × ,,	,,	119	0	0	119	0	0	0	0
34–37	Murasaki-moture × ,,	Japan proper	121	6	13	102	6	1	4	1
38–45	Murasaki-higeyori-kawari × ,,	,,	62	3	37	22	7	3	3	1
46–47	Murasaki-ban × ,,	,,	71	0	3	68	0	0	0	0
48	Murasaki-waikei-moti × ,,	,,	17	0	3	14	0	0	0	0
49	Kazikabo × ,,	,,	20	0	1	19	0	0	0	0
—	Sankakuryûtô × ,,	,,	12	0	0	12	0	0	0	0
—	Tekikôtô × ,,	China	55	0	0	55	0	0	0	0
—	Yôkatô × ,,	,,	12	0	0	12	0	0	0	0
—	Sôzyuku-kanonsen × ,,	,,	26	0	2	24	0	0	0	0
50–51	Tyûzyuku-kwahakukôtô × ,,	,,	30	3	2	25	2	0	2	0
—	Banzyuku-taikyokukôtô × ,,	,,	50	0	7	43	0	0	0	0
—	Russian-No. 25 × ,,	Russian	18	0	5	13	0	0	0	0
—	Russian-No. 26 × ,,	,,	28	0	2	26	0	0	0	0
—	Russian-No. 76 × ,,	,,	17	0	0	17	0	0	0	0
—	Russian-No. 85 × ,,	,,	10	0	0	10	0	0	0	0
—	Russian-No. 87 × ,,	,,	24	0	0	24	0	0	0	0
52	Russian-No. 114 × ,,	,,	11	0	6	5	0	0	0	0
—	Bidri × ,,	India	54	0	0	54	0	0	0	0
—	Yanjro × ,,	,,	22	0	0	22	0	0	0	0
	Total		1502	13	160	1329	27	14	10	3
	% for the total flowers pollinated			0.84	10.65	88.48				

TABLE III. Parental contrasting characters and their F_1 manifestation

	Characters	*O. minuta*	Wase-aikoku	Murasaki-moture	Murasaki-higeyori-kawari	Wase-aikoku × *O. minuta*	Murasaki-moture × *O. minuta*	Murasaki-higeyori-kawari × *O. minuta*
Awn	length	long	fairly long	long	long	long	long	long
	density	dense	dense	dense	dense	dense	dense	dense
	colour	colourless*	red purple	purple	purple	purple	purple	purple
Spikelet	size	small	normal	normal	normal	inter-mediate	inter-mediate	inter-mediate
	colour of the tip	colourless*	purple	purple	purple	purple	purple	purple
	colour of the flower glumes	colourless*	colourless	purple*	purple*	colourless*	colourless°*	colourless°*
	colour of the empty glumes	colourless*	colourless	purple	purple	colourless	purple base	purple base
	deciduousness	deciduous	not deciduous	not deciduous	not deciduous	deciduous	deciduous	deciduous
Stigma	habit of exposure	exposed	normal	normal	normal	exposed	exposed	exposed
	colour	purple	colourless	purple	purple	purple	purple	purple
Leaf	shape of ligules	short, not acute	long, acute	long, acute	long, acute	short, not acute	short not acute	short, not acute
	colour of ligules	colourless	colourless	purple	purple	colourless	purple	purple
	auricle	glabrous	haired	haired	hairhd	haired	haired	haired
	length of the terminal leaf-blade	short	long	long	long	short	short	short
	width of the terminal leaf-blade	narrow	wide	wide	wide	wide	wide	wide
	colour of the leaf-blade	colourless	colourless	self purple	self purple	colourless	purple inter-mediate	purple inter-mediate
	colour of the leaf-sheath	purple streak	colourless	self purple	self purple	purple streak	purple inter-mediate	purple inter-mediate
Stem	thickness	thin	thick	thick	thick	thick	thick	thick
	colour of the internode	colourless	colourless	purple	purple	colourless	purple	purple
	colour of the node	colourless	colourless	purple	purple	colourless	purple	purple
Habit		procumbent	erect	"en-tangled"	erect	semi-procumbent	semi-procumbent	semi-procumbent
Plant height		low	high	high	high	high	inter-mediate	inter-mediate
Panicle habit		spreading	closed	closed	closed**	spreading	spreading	spreading
Panicle length		short	long	long	long	inter-mediate	inter-mediate	inter-mediate

Note: * purple brown in maturity.
°* purple spot on the base in young.
** with scattered spikelets, the character being recessive.

length, the dates under the natural condition being in the same order Sept. 16th., Sept. 30th. and Sept. 25th. Thus the F_1 plants in their second year produced the panicle much earlier than the author had expected, but shooting was still forced clearly by the short day treatment. This forcing might have been effective on the sporogenesis and fertility of the plant.

Although the contrasting characters of the parental species, and their phenotypic manifestations in each kind of F_1 plants are represented in Table III, some descriptions may be added here in a more general way.

As already mentioned, *O. minuta* is characterized by its procumbent growth habit, and its short and slender culms with tender leaf-blades. The hybrids are semiprocumbent, producing thick culms of intermediate length, the leaf-blades being somewhat tender. *O. minuta* also differs from *O. sativa* in its short ligules, small glabrous auricles and short terminal leaf-blades which are only slightly narrower than the blades of *sativa*. The terminal leaf-blades of the hybrids are nearly as short as the *minuta's* blade, though they approximate in width to those of *sativa*. The ligules are, in the hybrids, slightly longer, but not so long and acute as *sativa* ligules. The auricles of the hybrids assume intermediate size and they are covered with short hairs. Short, spreading panicles, producing markedly small and hightly deciduous spikelets, also form another characteristics of *O. minuta*. The ears of the hybrids are intermediate in length and of rather spreading type, the caryopses being intermediate in size and highly deciduous. The anthers of *minuta* expose themselves fully out of the flowering glumes, while those of *sativa* do not. The anthers of the hybrids are exposed. Special mutant characters of *sativa*, "entangled tillering" and "scattered spikelets" are perfectly recessive (Figs. 2, 3 and 4).

After all, the F_1 hybrids resemble *O. minuta* more closely in some characters than they do *O, sativa*, in other characters resembling *O. sativa* more closely, or being intermediate of the parental species. The degree of predomination of a parental character in the hybrid differs in some cases with different varieties of *sativa* (Table III and VI).

Fertility of hybrids

The fertility of the hybrids is very low even by open pollination. Taking 15 normal panicles out of the 3 individuals subjected to the short day treatment, the fertility was calculated, in 1936, as 7.03, 7.57 and 7.59% respectively for F_1-22, F_1-37 and F_1-42. The fertility calculated, in 1937, on the whole panicles of 3 individuals forced by the treatment

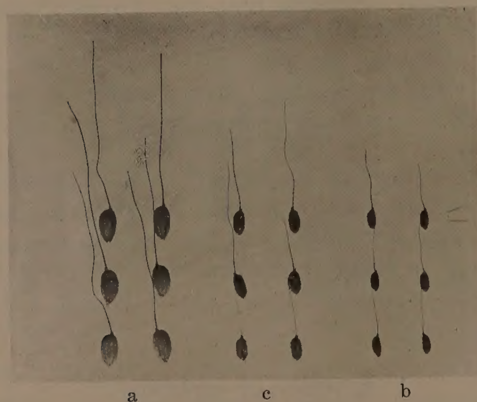


2



3

Fig. 2. F_1-22, Wase-aikoku × *minuta*.
Fig. 3. F_1-37, Murasaki-moture × *minuta*.



a c b

Fig. 4. Comparison of the spikelets.
a. Wase-aikoku; b. *O. minuta*; c. F_1-22.

TABLE IV. Some measurements on parents and hybrids

	Height of plant cm.	Length of culm cm.	Length of panicle cm.	Thickness of culm mm.	Terminal leaf-blade		Length of spikelet	Width of spikelet
					Length cm.	Width cm.		
O. minuta	79.9	67.5	12.4	2.5	11.2	1.1	4.6	1.8
Wase-aikoku	98.0	79.1	18.9	3.8	32.0	1.4	7.1	3.7
Murasaki-moture	100.6	81.7	18.9	3.0	24.8	1.3	6.8	3.5
Murasaki-higeyori-kawari	109.7	87.2	22.5	3.5	34.3	1.8	8.3	3.8
Wase-aikoku × *m.*	94.5	77.8	16.6	3.5	13.6	1.4	5.6	2.4
Murasaki moture × *m.*	84.9	70.5	14.4	3.3	12.3	1.4	5.6	2.4
Murasaki-higeyori-kawari × *m.*	93.9	77.7	16.2	3.5	13.5	1.5	5.3	2.4

was markedly lower, the percentages being in the same order 0.64, 0.03 and 0.27%. The F_2 grains were infected badly by bunt, and chiefly for that reason none of them could germinate. No F_2 plants are yet obtained.

Cytological observations

The microsporogenesis was studied chiefly on the material fixed in 1936, as the materials of the next year carried almost no pollen-mother-cells of proper meiotic stages. The somatic chromosomes were studied exclusively in the root-tip cells. The kinds of the fixing solutions and other methods used were the same as those adopted by the author in his other *Oryza* investigations (3).

Observations on somatic chromosomes

The gametic number of chromosomes is 12 for all *sativa* varieties used, the number for *minuta* being 24. The F_1 hybrid, as has been expected, possesses 36 chromosomes in the somatic cell (Fig. 5). No distinction between *sativa* and *minuta* chromosomes, however, is possible in the hybrid nucleus.

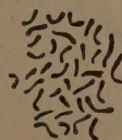


Fig. 5. Somatic chromosomes in the root-tip cell of the F_1, *O. sativa* × *O. minuta*. ×2670

Observations on microsporogenesis

Owing to scantiness of the normal pollen-mother-cells, and their degeneration at any stages of meiosis, the study of the proper meiotic

processes in those hybrids was a fairly labourious task. As no essential differences in the mode of meiosis were noticed, the results of observations on those three kinds of hybrids, namely, F_1-22, F_1-37 and $F_1$42, were brought together in the following descriptions.



Fig. 6. A diakinetic nucleus of the hybrid. ×2670

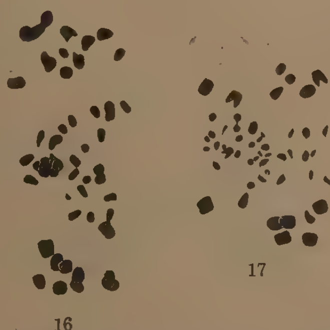
Heterotypic division: The early prophasic stages were not followed in this study. The nucleus in diakinesis, though curious to say, met with very seldom, contained no doubt about 36 chromosomes, showing no regular formation of bivalents. The nucleus shown in Fig. 6 contains 36 univalent chromosomes only. To decide the degree of bivalent formation if any, the author carefully examined more than 40 pollen-mother cells in the metaphase or early anaphase of the first meiotic division.



Figs. 7–15. Side views of the heterotypic metaphase of the F_1, *O. sativa* × *O. minuta*; 7, 8, 9, 13, 14 and 15. with 36 univalents only, in 14. one univalent is found in the next section; 10 and 12. with 34 univalents and 1 bivalent; 11 with 30 univalents and 3 bivalents. ×2000

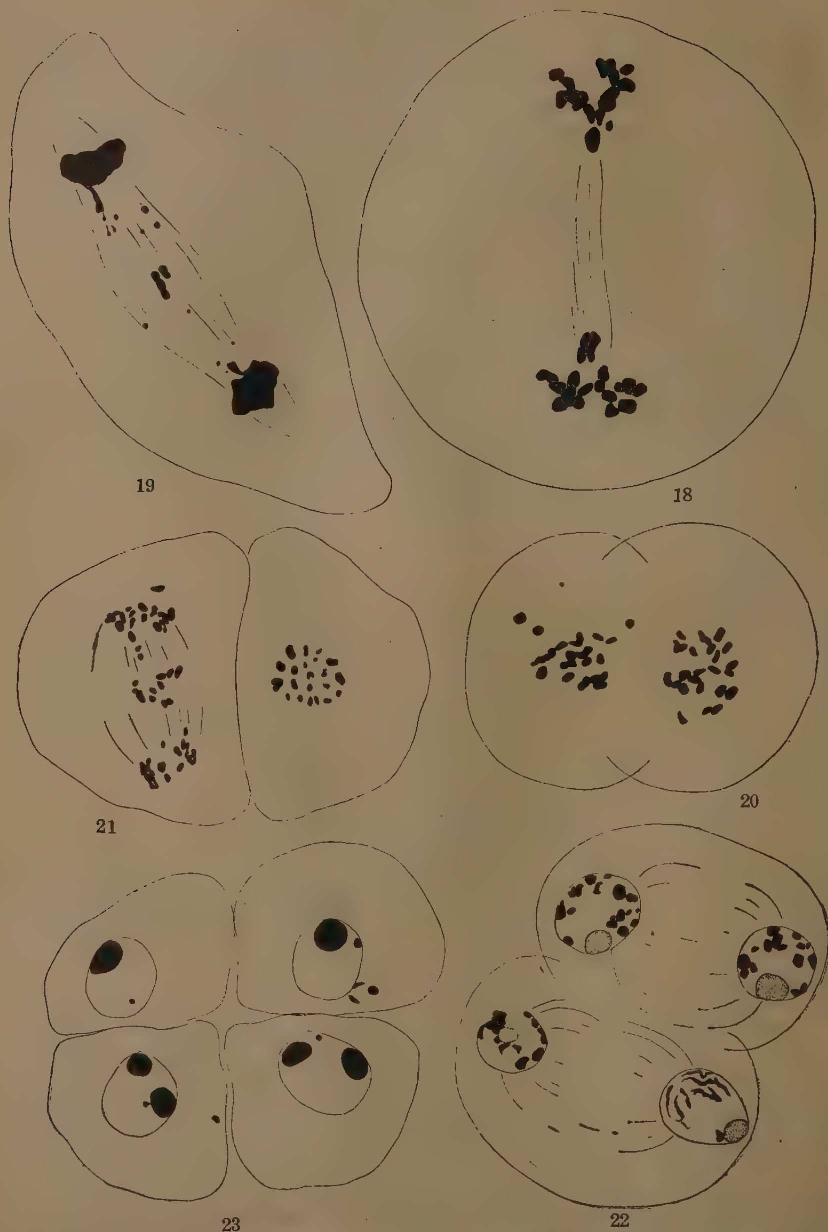
Though the exact counting of the whole chromosomes with the discrimination of their valency was fairly difficult in some of those cells, the number of total chromosomes contained always approximated closely to 36. Those nuclei depicted in Figs. 7, 8, 9, 13, 14 and 15 are the examples in which 36 univalents only were counted. Occasionally one, and infrequently two or three clear bivalents were also noticed in those stages. Figs. 10 and 12 show 1 bivalent and 34 univalents, while Fig. 11 contains 3 bivalents (one of which has disjoined already) and the corresponding number of univalents. From those observations on diakinesis and the following metaphase, it is concluded that the bivalent formation, though not at all excluded, occurs only infrequently for a few chromosomes. The univalent chromosomes showed, in some nuclei, a tendency to come in or near the equatorial plate of the metaphasic spindle (Figs. 11, 12, 14 and 15). Such univalents disjoined sooner or later (Figs. 16 and 17). Thus a comparatively large number of lagging chromosomes were met with in some late anaphasic nuclei, though they were not observed in others (Fig. 18).

Homotypic division: In the homotypic metaphase, the chromosomes arranged themselves rather regularly on the equatorial plate, leaving only a few occasional ones in the cytoplasm (Fig. 20). In the anaphase, however, a variable number of lagging chromosomes were usually met with. A comparatively small number of pollen mother cells, in which the nuclear and cell divisions were carried through in the proper manner, finally produced the tetrad cells of nearly equal size (Figs. 22 and 23).



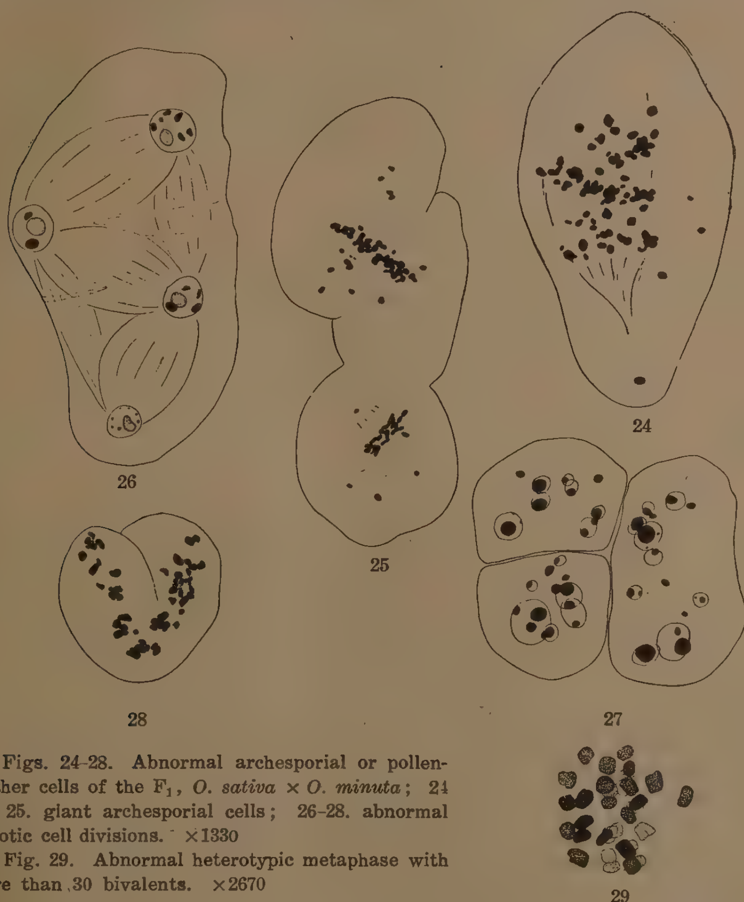
Figs. 16 and 17. Side views of the heterotypic anaphase of the F_1, *O. sativa* × *O. minuta*; splitting of univalents in the equatorial region. ×2670

Irregularities: Not only did the nucleus of the pollen-mother cell degenerate at any stage of meiosis, but the cell divisions which accompanied it were disturbed markedly in many cases. Examples of the latter are shown in Figs. 26, 27 and 28. No doubt, abnormal nuclear and cell divisions also occurred early in the archesporial tissue. The resultant giant abnormal cells were of frequent occurrence among the normal pollen-mother cells (Figs. 24 and 25). The cell depicted in Fig. 29 shows another type of abnormality. Nearly all of the metaphasic chromosomes encountered were presumed by their size and shape to be bivalents.



Figs. 18 and 19. Heterotypic late anaphase of the F_1, *O. sativa* × *O. minuta*. ×2000
Figs. 20–23. Homotypic division in the F_1, *O. sativa* × *O. minuta*; 20. homotypic metaphase; 21. homotypic anaphase; 22. homotypic telophase; 23. tetrad cells. ×2000

Another cell of a similar appearance was also found in the same anther locule. These cells suggest strongly the occurrence of occasional chromosome doubling in the archesporial cell.



Figs. 24–28. Abnormal archesporial or pollen-mother cells of the F_1, *O. sativa* × *O. minuta*; 24 and 25. giant archesporial cells; 26–28. abnormal meiotic cell divisions. ×1330

Fig. 29. Abnormal heterotypic metaphase with more than 30 bivalents. ×2670

Conclusion

Observing some size differences between the chromosomes of *O. officinalis* WALL., 2n=24 and *O. sativa* L., 2n=24, and also some size differences among differently shaped chromosomes of *O. minuta* PRESL., 2n=48, NANDI (8) has concluded that *O. minuta* PRESL. is an allo-octoploid species which has probably originated by hybridization between *O. offici-*

nalis×*O. sativa.* It is supposed collaterally by him that as *O. minuta* is an allo-octoploid species, so it will not hybridize with *O. sativa.* In fact, hybridization between *O. sativa* and *O. minuta* is not easy, but it is certainly not impossible. In the present experiments, 1.1% of *sativa* flowers pollinated with the pollen of *minuta* produced germinable F_1 seeds, and the percentage was still higher (3.3%) in the same experiments of OKURA (9). Both these workers, however, failed to obtain germinable F_1 seeds in the reciprocal cross *O. minuta*×*O. sativa.* The failure of hybridization in the latter case will be explained on some physiological grounds as we know already that the pollen grains of *sativa* fail to germinate on the stigma of *minuta* (4).

In the present experiments, the germinable F_1 seeds were obtained, with one exception of uncertain Russian kind, only between Japanese varieties of rice viz. *O. sativa* L. subsp. *Japonica* KATO and *O. minuta* PRESL. OKURA also failed to produce hybrid between *O. sativa* L. subsp. *Indica* KATO and *O. minuta* PRESL., though he obtained, with apparently the same efforts, 4 F_1 plants with subsp. *Japonica.* This coincidence of results of the two workers' experiments seems to the author more than chance.

It is clearly demonstrated by these experiments that the *sativa* set chromosomes fail to pair in meiosis with the chromosomes of *minuta.* In fact, one or more occasional bivalent chromosomes were met with, but bivalent formation to an equal degree was also noticed among the haploid chromosomes of *sativa* (3). The chromosome complex of *O. minuta* PRESL. is, no doubt, composed of 2 dissimilar chromosomal sets with 12 componental chromosomes respectively (5 and 7). Now, taking the failure of chromosomes in making bivalents as a proof of deficient homology, the author concludes that neither one of the 2 chromosomal sets of *O. minuta* is homologous to the set which is found in *O. sativa.*

Thus, the hypothesis that *O. minuta* PRESL. is a stable fertile hybrid of *O. officinalis* and *O. sativa* can hardly be maintained. According to RAMANUJAM (10), 12 componental chromosomes of the *O. officinalis* set are larger than the 12 chromosomes of the *sativa* set, and the former set chromosomes fail to pair with those of the latter. Whether, or not, *O. officinalis* WALL. has taken part in the production of *O. minuta* PRESL. is another problem to be solved. Concerning the affinity between *sativa* and *minuta* chromosomes, OKURA's preliminary report contains quite different observations, but the criticism of these would seem more appropriate at some later day on the basis of his full report.

According to the quotation at the beginning of this paper, ROSCHEVICZ has concluded that the cultivated rices have originated not only from *O. sativa* L. f. *spontanea*, but also from other rice species akin to *O. sativa*

L., such as *O. breviligulata*, *O. glaberrima*, *O. minuta* and *O. officinalis*, etc. After all the efforts of many workers on rice, however, neither a cultivated variety with 2 chromosomal sets (24 gametic chromosomes), nor a cultivated variety with a set which differs in affinity from the normal has yet been described. Are the cultivated rices still so polyphyletic as assumed by ROSCHEVICZ? In any case, the hypothesis that *O. officinalis* and *O. minuta* had taken part in the production of Asiatic cultivated rice varieties, is not, so far, corroborated by the results of the cytological studies.

Summary

1. Since 1934, the author has been engaged in cytogenetical studies of various interspecific hydrids of *Oryza*. In this paper, the author presents the results obtained by him on one of those hybrids, *O. sativa* L.×*O. minuta* PRESL.

2. The hybridization between *O. sativa* and *O. minuta* was successful only when the former species was chosen on the maternal side. The pollen grains of *O. sativa* apparently failed to germinate on the stigma of *O. minuta*.

3. The author used in the experiments two types of *O. sativa* L., namely, subsp. *Japonica* KATO and subsp. *Indica* KATO. Germinable F_1 seeds between the two species were obtainable, excepting one uncertain case, only with subsp. *Japonica*.

4. The majority of the F_1 plants could not survive the plumule stage. Thus the author could raise only 3 adult F_1 plants; Wase-aikoku×*minuta*, Murasaki-moture×*minuta* and Murasaki-higeyori-kawari×*minuta*.

5. The F_1 hybrid resembled *O. minuta* more closely in some characters than it did *O. sativa*; in other characters resembling *O. sativa* more closely, or being intermediate of the parents. The degree of predomination of a parental character in the hybrid differed in some cases with different varieties of *sativa*.

6. The F_1 hybrids were highly sterile, and very liable to the infection of bunt. For these reason, no F_2 plants were obtainable.

7. In the meiosis of the hybrids, no regular bivalent formation was noticed, though 1–3 bivalents were met with occasionally. From those observations, the author concludes that the chromosomal set of *O. sativa* L. is not homologous to either one of the 2 chromosomal sets composing the chromosome complex of *O. minuta* PRESL. Thus *O. minuta* can not be taken as a stable hybrid of *O. sativa* and other species.

8. As neither a cultivated rice variety with 2 chromosomal sets (24 gametic chromosomes), nor that with a set differing in affinity from

the normal has been discovered, *O. minuta* PRESL. and *O. officinalis* WALL. can hardly be taken as the progenitors of cultivated rice varieties.

PLANT BREEDING LABORATORY
KYUSHU IMPERIAL UNIVERSITY

Literature cited

1. GOTOH, K. and OKURA, E., 1933. A preliminary report on cytological studies of *Oryza* (in Japanese). Journ. Soc. Tropic. Agric. **5**: 363-364.
2. KATO, S., 1930. On the affinity of the cultivated varieties of rice plant, *Oryza sativa* L. Journ. Coll. Agric. Kyushu Imp. Univ. **2**: 241–276.
3. MORINAGA, T. and FUKUSHIMA,, E., 1934. Cytogenetical studies on *Oryza sativa* L. I. Studies on the haploid plant of *Oryza sativa*. Japan. Journ. Bot. **7**: 73–106.
4. ————, 1934. Some observations on *Oryza minuta* PRESL. (in Japanese). Japan. Journ. Genet. **10**: 91–92.
5. ————, 1937. On the microsporogenesis of the various interspecific hybrid of *Oryza* (a preliminary note in Japanese). Japan. Journ. Genet. **12**: 245.
6. MORINAGA, T. and AOKI, M., 1938. Interspecific hybrids in *Oryza* (in Japanese). Agric. and Hortic. **13**: 1993–2005.
7. ————, 1939. Cytogenetics on *Oryza* (in Japanese). Botany and Zoology **7**: 197–201.
8. NANDI, H. K., 1936. The chromosome morphology, secondary association and origin of cultivated rice. Journ. Genet. **33**: 315–336.
9. OKURA, E., 1937. Cyto-genetical studies on *Oryza*. A preliminary note on interspecific hybrid between *O. sativa* L. and *O. minuta* PRESL. (in Japanese). Japan. Journ, Genet. **12**: 212–214.
10. RAMANUJAM, S., 1937. Cytological studies in the Oryzeae. III. Cytogenetical behaviour of an interspecific hybrid in *Oryza*. Journ. Genet. **35**: 223–258.
11. ROSCHEVICZ, R. J., 1931. A contribution to the knowledge of rice. Bull. Appl. Bot. Genet. and Plant-breed. **27**: 1–133.

Weitere Untersuchungen über die pentaploiden *Triticum*-Bastarde XI[1]

Von Seiji MATSUMURA

Hierzu 1 Textabbildung und 8 Tabellen

(Eingegangen am 3. Juli 1940)

Beziehungen zwischen den Chromosomenzahlen und der Gestalt sowie der Keimung der F_2-Körner des Bastards *T. persicum* × *T. compactum*

In der VIII. und IX. Mitteilung dieser Serie haben wir die Beziehungen zwischen der Chromosomenzahl und der Entwicklung der Endospermen sowie der Zeitdauer bis zur Keimung der Körner in den Rückkreuzungen der pentaploiden Bastarde (*T. polonicum*×*T. spelta* und *T. durum*×*T. vulgare*) zu beiden Eltern festgestellt. In der Rückkreuzung gehören alle Pflanzen zu den fertilen Chromosomenkombinationen, während bei den F_2-Nachkommen die fertilen und sterilen Kombinationen gemischt enthalten sind. In letzterem Fall müssen demnach die Beziehungen zwischen der Zahl der Chromosomen und der Gestalt sowie der Keimung der Körner komplizierter als in ersterem sein. Hier wurden die Gestalt und die Anzahl der Tage bis zur Keimung der verschiedenchromosomigen Körner in der F_2-Nachkommenschaft des Bastards *T. persicum* VAV. var. *stramineum* ZHUK. ($2n=28$)×*T. compactum* HOST var. *creticum* MAZZ. ($2n=42$) untersucht.

Abbildung 1 zeigt die F_2-Samenkörner in der Verbindung *T. persicum* ×*T. compactum*, wobei die somatischen Chromosomenzahlen in den Wurzelspitzen von MATSUMURA *et alii* (1939) bestimmt wurden. In F_2 war eine so regelmässige Beziehung zwischen der Chromosomenzahl und der Gestalt der Körner (oder der Entwicklung der Endospermen), wie sie in den Rückkreuzungen beobachtet wurde, nicht nachweisbar (VIII. und IX. Mitt.). Dies müsste darauf beruhen, dass, da die Chromosomenzahlen der befruchteten weiblichen oder männlichen Gameten nicht bestimmt werden können, diese sowie die Chromosomenformel der

(1) Contributions from the Laboratory of Genetics, Biological Institute, Department of Agriculture, Kyoto Imperial University, No. 114.

Endospermen in den F_2-Körnern unbekannt sind, während sie sich in den Rückkreuzungen mit 14- oder 21-chromosomigen Eltern aus den somatischen Chromosomenzahlen der Keimlinge erschliessen lassen.

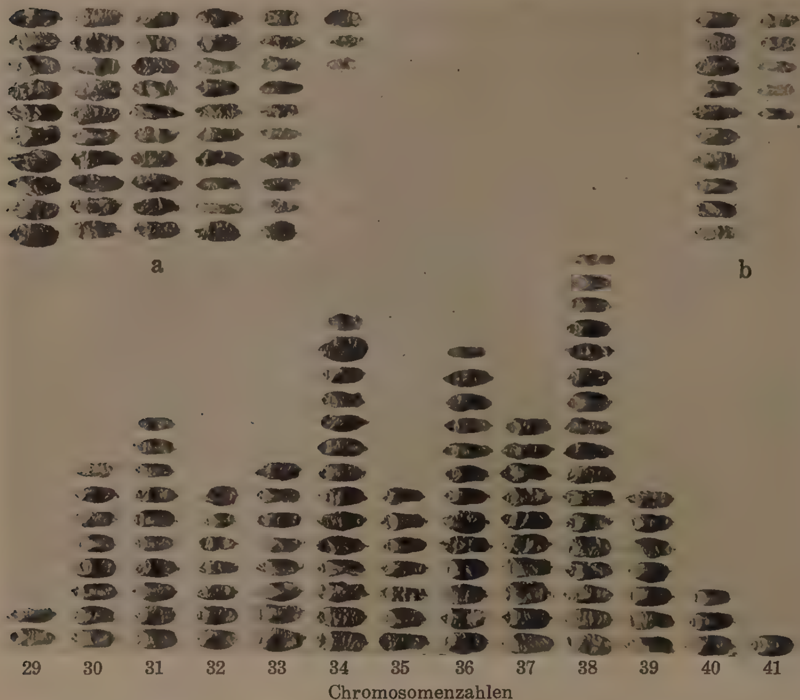


Abb. 1. F_2-Körner des Bastards *T. persicum* × *T. compactum.* (in natürlicher Grösse)
a. ungekeimt, b. von d. Keiml. eingegangen.

Im grossen und ganzen wurden viele runzelige Körner, wie Abbildung 1 zeigt, gefunden. Diese müssten demnach auf die Befruchtung der minderchromosomigen Embryosäcke mit den höherchromosomigen Spermakernen zurückzuführen sein. Es findet sich auch tatsächlich in dieser Hinsicht bestätigt, dass in dieser Verbindung *T. persicum*×*T. compactum* die höherchromosomigen Spermakerne deutlich tüchtig waren, ebenso wie in der Verbindung *T. polonicum*×*T. spelta* (V. und VI. Mitt.). Alle ungekeimten Körner und fast alle nach der Keimung eingegangenen Körner zeigten sich runzelig oder eingeschrumpft. Diese Körner mit mangelhaft entwickelten Endospermen dürften grösstenteils intermediäre Chromosomenzahlen haben (vgl. VIII. Mitt.). Die plumpen Körner waren im allgemeinen kleiner, als die Keimfähigkeit besitzenden runzeligen

Körner. Diese Verhältnisse stimmen mit denen in den Rückkreuzungen überein, besonders mit denen in der Verbindung *T. durum*×*T. vulgare* (VIII. und IX. Mitt.).

In der F_2-Nachkommenschaft wurden 181 Körner im Zimmer in viereckigen Pflanzentöpfen mit sterilem Sand mittags am 19. November 1935 ausgesät. Sie ergaben 128 Keimlinge, von denen im Laufe des Winters noch 15 Pflanzen eingingen. Von den überlebenden 113 Individuen wurden die somatischen Chromosomenzahlen bei 107 Pflanzen bestimmt. Tabelle 1, die als Korrelationstabelle eingerichtet ist, bringt

TABELLE 1. Korrelation zwischen der Chromosomenzahl und der Anzahl der Tage bis zur Keimung der F_2-Körner des Bastards *T. persicum*×*T. compactum*

Chromosomenzahl	Tage bis zur Keimung												Summe
	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
29		1			1								2
30	1	5	1	1									8
31	1	5	4										10
32	1	3	3										7
33		2	5		1								8
34	4	7	2		1								14
35	1	5				1							7
36	2	6	3		1				1				13
37	3	2	3	2									10
38	6	7	4										17
39	3	3		1									7
40	1	2											3
41	1												1
*	1	4	1										6
**	1	8	1		2				1		1	1	15
Summe	26	60	27	4	6	1	0	0	2	0	1	1	128

* Chromosomenzahl unbestimmt.
** Im Keimlingsstadium eingegangen.

die Beziehung zwischen der Chromosomenzahl und der Anzahl der Tage bis zur Keimung bei diesen Pflanzen zur Darstellung. Aus den später gekeimten Körnern stammten einige im Keimlingsstadium eingegangene Pflanzen.

In der 36- bis 41-chromosomigen Gruppe ist zwischen der Chromosomenzahl und der Zeitdauer bis zur Keimung deutlich eine negative

Korrelation zu beobachten, deren Koeffizient $r=-0.3193\pm0.0848$ ist, während die 29- bis 34-chromosomige Gruppe mit dem Korrelationskoeffizienten $r=-0.1004\pm0.0953$ keine merkliche Beziehung erkennen lässt.

Die Beziehungen zwischen der Chromosomenzahl und der Gestalt sowie der Keimung der Körner in der ersteren Gruppe stimmen im grossen und ganzen viel mehr mit denjenigen in der Aequationskreuzung F_1 ♀ × *T. vulgare* ♂ ($2n=35$–42), als mit denjenigen in der Zertationskreuzung *T. vulgare* ♀ × F_1 ♂ (IX. Mitt.) überein. In der 29- bis 34-chromosomigen Gruppe stehen dagegen diese Beziehungen nicht in Einklang mit den Beobachtungen bei der Aequationskreuzung F_1 ♀ × *T. durum* ♂ ($2n=28$–35), eher dürften sie noch mit den Verhältnissen bei der Zertationskreuzung *T. durum* ♀ × F_1 ♂ übereinstimmen.

Wiederholte Aequations- und Zertationskreuzungen des Bastards *T. polonicum* × *T. spelta*

Die Aequations- bzw. Zertationskreuzungen des Bastards *T. polonicum* × *T. spelta* betreffend, wurden die an einem umfangreichen Material gewonnenen Resultate bereits in der IV. bzw. VI. Mitteilung berichtet. Im Jahre 1939 habe ich die Aequations- und Zertationskreuzungen wiederholt. Wie aus Tabelle 2 ersichtlich wird, ist es uns gelungen, einen mittelmässigen Kreuzungserfolg zu erzielen, der diesmal merklich besser als in den Aequations- und Zertationskreuzungen des Bastards *T. polonicum* × *T. spelta* in der III. Mitteilung war. Auch der Kreuzungserfolg der gegenwärtigen Aequationskreuzungen war etwas schlechter als der in der IV. Mitteilung veröffentlichte, während die Zertationskreuzungen einen ähnlichen Erfolg zeigten, wie die des Jahres 1936 in der VI. Mitteilung.

TABELLE 2. Kreuzungserfolg bei Rückkreuzungen des Bastards *T. polonicum* × *T. spelta* zu den Eltern

Kreuzung	Zahl d. bestäubten Blütchen	Zahl d. Körner (%)	gekeimt %	(von d. Keiml. eingegangen)*	Erfolg %
F_1 × *T. spelta*	138	98 (71.0)	80 (81.6)	(1)	57.9
F_1 × *T. polonicum*	144	96 (66.7)	95 (99.0)	(1)	66.0
T. spelta × F_1	118	55 (46.6)	54 (98.2)	(0)	45.7
T. polonicum × F_1	125	60 (48.0)	36 (60.0)	(3)	28.8

* Die Chromosomenzahlen dieser Keimlinge wurden nicht bestimmt.

Die Körner wurden in Holzkisten mit steriler Erde am 31. Oktober 1939 ausgesät. Die Chromosomenzahlen habe ich alle in den Wurzel-

spitzen der Keimlinge gezählt, die zum grössten Teil im Dezember fixiert wurden. Nur 5 Keimlinge (1 in F_1×*T. spelta*, 1 in F_1×*T. polonicum* und 3 in *T. polonicum* × F_1) gingen ein, deren Wurzeln nicht fixiert werden konnten. Die Resultate sind aus Tabelle 3 zu ersehen. Eine

TABELLE 3. Häufigkeit der verschiedenchromosomigen Gonen des Bastards *T. polonicum*×*T. spelta* auf Grund der Rückkreuzungen

Kreuzung	Chromosomenzahl								Summe
	14	15	16	17	18	19	20	21	
F_1×*T. spelta*	2	10	13*	22	21	6	5	0	79
%	2.53	12.66	16.46	27.85	26.58	7.59	6.33	—	100
F_1×*T. polonicum*	5	10	21	23	18	12	4	1	94
%	5.32	10.64	22.34	24.47	19.15	12.77	4.25	1.06	100
T. spelta×F_1	4	2	1	1	1	5	16	23	53
%	7.55	3.77	1.89	1.89	1.89	9.43	30.19	43.39	100
T. polonicum×F_1	7	2	0	0	1**	6	9	8	33
%	21.21	6.06	—	—	3.03	18.18	27.28	24.24	100

* Unter diesen ist eine haploide Pflanze mit 16 Chromosomen, eine andere mit 37+f.
** Pflanze mit 32+f.

Pflanze mit unerwarteter Chromosomenzahl ($2n=43$) in *T. spelta* × F_1 wurde hier nicht berücksichtigt. Auch war eine in F_1 × *T. spelta* wider Erwarten 16-chromosomig. Diese Pflanze mag wohl durch die Parthenogenese der 16-chromosomigen unbefruchteten Eizelle des F_1-Bastards entstanden sein.

Die Variationsreihen stellen sich in beiden Aequationskreuzungen, F_1 × *T. spelta* und F_1 × *T. polonicum*, ähnlich dar. Die hier erzielten Ergebnisse stimmen im grossen und ganzen mit denjenigen des Versuchs mit hohem Kreuzungserfolg in der IV. Mitteilung überein, besonders was die Verbindung F_1 × *T. polonicum* anbelangt. Demnach geht aus den obigen Kreuzungsversuchen hervor, dass die Differenzen zwischen den beiden Aequationskreuzungen, F_1 × *T. spelta* und F_1 × *T. polonicum*, sich bei *ca.* 60%igem oder noch höherem Kreuzungserfolg ausgleichen.

Die Resultate der beiden Zertationskreuzungen, *T. spelta* × F_1 und *T. polonicum*×F_1, befanden sich in der Hauptsache im Einklang mit denjenigen des Jahres 1936 in der VI. Mitteilung. Die in beiden Versuchen erhaltenen Resultate sind in Tabelle 4 und 5 gemeinsam wiedergegeben.

Bei der Verbindung *T. polonicum* × F_1 mit niedrigem Kreuzungserfolg (28.5%) waren die 14-chromosomigen Pollenkörner diejenigen,

TABELLE 4. Kreuzungserfolg bei den Zertationskreuzungen in den Jahren 1939 und 1940 (Zusammenfassung von Tab. 6, VI. Mitt. und Tab. 2, XI. Mitt.)

Kreuzung	Zahl d. bestäubten Blütchen	Zahl d. Körner (%)	ausgesät	gekeimt (%)	(von d. Keiml. eingegangen	Erfolg %
T. spelta × F_1	280	152 (54.3)	151	143 (94.7)	(1)	51.4
T. polonicum × F_1	349	166 (47.6)	164	98 (59.8)	(12)	28.5

TABELLE 5. Häufigkeit der verschiedenchromosomigen Pollenkörner des Bastards *T. polonicum* × *T. spelta* auf Grund der Zertationskreuzungen mit mittelmässigem Kreuzungserfolg (Zusammenfassung von Tab. 9, VI. Mitt. und Tab. 3, XI. Mitt.)

Kreuzung	Chromosomenzahl								Summe
	14	15	16	17	18	19	20	21	
T. spelta × F_1	12	8	4	4	6	16	36	55	141
%	8.51	5.67	2.84	2.84	4.25	11.35	25.53	39.01	100
T. polonicum × F_1	25	8	4	1	6	15	16	19	94
%	26.60	8.51	4.26	1.06	6.38	15.96	17.02	20.21	100

welche am häufigsten befruchtet haben. Dies dürfte in erster Linie auf der Elimination der zygotischen Kombinationen von 14-chr.Eizelle+ 21-chr.Spermakern infolge mangelhafter Keimung beruhen, wie dies bereits in der IX. Mitteilung behauptet wurde. Wenn der Kreuzungserfolg *ca.* 55% übersteigt, dürften sich auch die Differenzen zwischen den beiden Zertationskreuzungen *T. spelta* × F_1 und *T. polonicum* × F_1 ausgleichen, was wir auf Grund unserer in der VI. und in der gegenwärtigen Mitteilung niedergelegten Versuche schliessen möchten.

Die zwischen der Anzahl der Tage bis zur Keimung der Körner und der Chromosomenzahl in den Aequationskreuzungen bestehende Beziehung ist in Form einer Korrelationstabelle zur Darstellung gebracht (Tab. 6). In der Verbindung F_1 × *T. spelta* ist deutlich eine negative Korrelation zu erkennen, deren Koeffizient $r = -0.3805 \pm 0.0653$ ist. Die Verbindung F_1 × *T. polonicum* weist dagegen gar kein korrelatives Verhältnis zu dem Koeffizienten $r = +0.0243 \pm 0.0695$ auf.

Die Korrelation zwischen der Chromosomenzahl und der Anzahl der Tage bis zur Keimung der Körner in Zertationskreuzungen ist in Tabelle 7 wiedergegeben. Die Resultate sind, verglichen mit denjenigen der VIII. Mitteilung, nahezu gleich. Aus der Zusammenfassung der beiden Versuche (Tab. 7 in dieser Mitt. und Tab. 3 in der VIII. Mitt.) ergibt sich die folgende Tabelle (Tab. 8), ausgenommen sind die Keimlinge mit

TABELLE 6. Korrelation zwischen der Chromosomenzahl und der Anzahl der Tage bis zur Keimung der Körner bei Aequationskreuzungen

Kreuzung	Chromosomenzahl	Tage bis zur Keimung						Summe
		3	4	5	6	7	8	
$F_1 \times$ *T. polonicum* ($r = +0.0243 \pm 0.0695$)	28	4		1				5
	29	2	7		1			10
	30	4	8	6	3			21
	31	4	13	5	1			23
	32	2	14	1	1			18
	33	1	9	2				12
	34	1	1	2				4
	35	1						1
	**						1	1
	Summe	19	52	17	6	0	1	95
$F_1 \times$ *T. spelta* ($r = -0.3805 \pm 0.0653$)	35		1		1			2
	36	1	7	2				10
	37	5	3***	3			1	12
	38	8	12	1	1			22
	39	12	8	1				21
	40	3	2	1				6
	41	5						5
	16*			1				1
	**		1					1
	Summe	34	34	9	2	0	1	80

* Unerwartet.
** Im Keimlingsstadium eingegangen.
*** Pflanze mit 37+f. Chromosomen.

unerwarteten Chromosomenzahlen und die Pflanzen, die im Keimlingsstadium vor Bestimmung der Chromosomenzahl eingegangen sind. Im grossen und ganzen keimten die Körner von *T. spelta* $\times F_1$ früher als die von *T. polonicum* $\times F_1$. Bei der letzteren Verbindung ist zwischen der Chromosomenzahl und der Zeitdauer bis zur Keimung eine positive Korrelation zu beobachten, deren Koeffizient $r = +0.2485 \pm 0.0407$ ist, während die Verbindung *T. spelta* $\times F_1$ mit dem Korrelationskoeffizienten $r = -0.1277 \pm 0.0354$ fast kein korrelatives Verhältnis erkennen lässt.

Bei den Verbindungen F_1 ♀ × *T. spelta* ♂ und *T. polonicum* ♀ × F_1 ♂ ist zu erkennen, dass eine deutlich in der ersteren Verbindung negative

TABELLE 7. Korrelation zwischen der Chromosomenzahl und der Anzahl der Tage bis zur Keimung der Körner bei Zertationskreuzungen

Kreuzung	Chromosomenzahl	Tage bis zur Keimung							Summe
		3	4	5	6	7	8 ···	14	
T. polonicum × F_1	28		3	2	2				7
	29		1	1					2
	32			1***					1
	33	2	3	1					6
	34		7	2					9
	35		2	4	2				8
	**			1			1	1	3
	Summe	2	16	12	4	0	1 ····	1	36
T. spelta × F_1	35	2	2						4
	36	1	1						2
	37		1						1
	38	1							1
	39	1							1
	40	3	2						5
	41	10	5	1					16
	42	19	4						23
	43*	1							1
	Summe	38	15	1					54

* Unerwartet.
** Im Keimlingsstadium eingegangen.
*** Pflanze mit 32+f. Chromosomen.

bzw. in der letzteren positive Korrelation zwischen der Chromosomenzahl und der Zeitdauer bis zur Keimung der Körner besteht, während die Kreuzungen F_1 ♀ × *T. polonicum* ♂ und *T. spelta* ♀ × F_1 ♂ keine solche Korrelation konstatieren lassen. Die Samen waren bei den Verbindungen F_1 × *T. polonicum* und *T. spelta* × F_1 fast alle dickkörnig. Hingegen wurden viele schlanke und runzelige oder eingeschrumpfte Körner bei den Verbindungen F_1 × *T. spelta* und *T. polonicum* × F_1 gewonnen. Die Zunahme der Runzeligkeit bei den Endospermen geht Hand in Hand mit dem Steigen der Anzahl der Chromosomen in der letzteren bzw. ihrer Verminderung in der ersteren (vgl. VIII. und IX. Mitt.). Je runzeliger die Körner sind, desto später dürfte demnach die Keimung auftreten.

Diese Untersuchung wurde auf Anregung und unter Leitung von Herrn Professor Dr. H. KIHARA ausgeführt, dem ich auch hier meinen herzlichsten Dank aussprechen möchte.

TABELLE 8. Korrelation zwischen der Chromosomenzahl und der Anzahl der Tage bis zur Keimung der Körner bei den bisherigen Zertationskreuzungen (Zusammenfassung von Tab. 3, VIII. Mitt. und Tab. 7, XI. Mitt.)

Kreuzung	Chromosomenzahl	Tage bis zur Keimung								Summe
		3	4	5	6	7	8	9	10	
	28	2	29	12	5					48
	29		11	6	1					18
	30		5	2						7
T. polonicum × F_1	31	1	1	1						3
($r = +0.2485 \pm 0.0407$)	32		8	4	2					14
	33	4	20	8	1	1				34
	34	1	20	14	9			1	1	46
	35	1	20	28	20			2		71
	Summe	9	114	75	38	1	0	3	1	241
	35	11	21	5						37
	36	5	15	5						25
	37	2	6	1						9
T. spelta × F_1	38	3	5	3						11
($r = -0.1277 \pm 0.0354$)	39	4	12		1					17
	40	9	20							29
	41	35	47	6		1				89
	42	62	58	11		1	1			133
	Summe	131	184	31	1	2	1			350

Zitierte Literatur

KIHARA, H., WAKAKUWA, SH. und YAMAMOTO, Y. 1933. Weitere Untersuchungen über die pentaploiden *Triticum*-Bastarde. III. Japan. Journ. Bot. **6**.

——, —— 1935. Idem. IV. Ibid. **7**.

MATSUMURA, S. 1936a. Idem. V. Ibid. **8**.

—— 1936b. Idem. VI. Ibid. **8**.

—— 1938. Idem. VIII. Ibid. **9**.

—— 1939. Idem. IX. Ibid. **9**.

MATSUMURA, S., MATSUMOTO, K., YAMASHITA, K. und NAKAMURA, Y. 1939. Häufigkeit der verschiedenchromosomigen F_2-Pflanzen bei den pentaploiden Weizenbastarden. Bot. & Zool. **7**.

Weitere Untersuchungen über die pentaploiden *Triticum*-Bastarde XII

Schlussmitteilung[1]

Von H. KIHARA und S. MATSUMURA

Hierzu 3 Textabbildungen und 5 Tabellen

(Eingegangen am 3. Juli 1940)

Einleitung

Seit KIHARA im Jahre 1925 diese weiteren Untersuchungen über die pentaploiden *Triticum*-Bastarde angefangen hat, wurden 11 Mitteilungen dieser Serie während der letzten 15 Jahre publiziert. Wir denken, dass die Haupterkenntnisse, was den Mechanismus und die Physiologie hinsichtlich der Chromosomenzahlschwankungen in den weiteren Generationen anbelangt, an Hand der pentaploiden Weizenbastarde gewonnen wurden. Es sei uns deshalb gestattet, im folgenden jetzt einen Gesamtüberblick auf diesem Gebiete zu geben und so unsere Arbeit abzuschliessen.

Nach KIHARA (1924) haben die pentaploiden *Triticum*-Bastarde 35 somatische Chromosomen, von denen 21 dem Dinkel- und 14 dem Emmerelter angehören. In der ersten Reifungsteilung treten 14 Gemini und 7 Univalente auf. Bei den ersteren tritt eine normale Reduktions- bzw. Aequationsteilung in der heterotypischen bzw. homöotypischen Kernteilung auf. Die letzteren werden in der Regel in der I. Anaphase längsgeteilt. Die so entstandenen Spalthälften werden in der II. Reifungsteilung ohne weitere Längsteilung auf die beiden Pole verteilt. Die Verteilungsweise der 7 Univalenten findet, wenn man annimmt, dass sie dem Zufall folgt und von einer Elimination absieht, ihren Ausdruck in der binomialen Formel $(0.5+0.5)^7$. In den Gonen der 35-chromosomigen F_1-Bastarde sind die Chromosomenzahlen von 14 bis 21 möglich.

In der F_2-Generation sind 28 bis 42 somatische Chromosomen zu erwarten. Solche Pflanzen wurden in Wirklichkeit durch die umfangreichen Untersuchungen von MATSUMURA (1936a) und MATSUMURA *et alii* (1939) festgestellt (Tab. 1). Bei freier Kombination der 14- bis 21-

---

(1) Contributions from the Laboratory of Genetics, Biological Institute, Department of Agriculture, Kyoto Imperial University, No 115.

TABELLE 1. Häufigkeit der 28- bis 42-chromosomigen F_2-Pflanzen des pentaploiden Bastards auf Grund der bisherigen Untersuchungen

Kreuzung	Chromosomenzahlen															Summe
	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	
T. polonicum × *T. spelta* (V. Mitt.)	16	18	36	37	47	50	48	67	81	77	75	60	42	16	5	675
T. durum × *T. vulgare* (MATSUMURA *et al.*, 1939)	6	16	6	10	9	9	9	7	10	14	9	6	3	2	0	116
T. persicum × *T. compactum* (MATSUMURA *et al.*, 1939)	0	2	8	10	7	8	14	7	13	10	17	7	3	1	0	107
Theoretisch nach $(0.5+0.5)^{14}$	1	14	91	364	1001	2002	3003	3432	3003	2002	1001	364	91	14	1	16384
Theoretisch (Nur fertile Kombination) (KIHARA, 1924)	1	14	84	280	560	672	448	128	448	672	560	280	84	14	1	4246

chromosomigen Keimzellen und ohne Univalentenelimination müssten sich, wenn alle erwarteten Chromosomengarnituren eine gleiche Lebensfähigkeit bewirken würden, die verschiedenchromosomigen F_2-Zygoten mit der aus der Formel $(0.5+0.5)^7 \times (0.5+0.5)^7 = (0.5+0.5)^{14}$ gewonnenen Häufigkeit einstellen (Tab. 1). Die gefundene Häufigkeit weicht aber merklich von der theoretischen ab, und zwar sind zwei wichtige Unterschiede zwischen der gefundenen und der theoretischen Häufigkeit zu konstatieren, nämlich eine deutliche Schiefheit und eine auffallende Flachheit, wobei der Grad dieser Abweichungen den verschiedenen pentaploiden Verbindungen nach ebenfalls sehr verschieden ist. In dieser Schlussmitteilung berücksichtigten wir hauptsächlich in den Verbindungen *T. polonicum* × *T. spelta* und *T. durum* × *T. vulgare* die Faktoren, die viel zu diesen Abweichungen in der Häufigkeit der verschiedenchromosomigen F_2-Pflanzen beitragen. THOMPSON (1934) diskutierte dieses Problem, die näheren Umstände wurden aber leider an verschiedenen Verbindungen nachgeprüft.

Häufigkeit der verschiedenchromosomigen Gonen des F_1-Bastards

Die 14- bis 21-chromosomigen Embryosäcke sind nicht nur fast alle funktionsfähig, sondern werden auch tatsächlich unter genügender Bestäubung fast alle befruchtet. In seltenen Fällen wurden Degenerationszeichen des Embryosacks bei mikroskopischer Beobachtung des Bastards *T. spelta* × *T. polonicum* (etwa 1.8%) festgestellt (II. Mitt.).

KIHARA und WAKAKUWA (1935a) beobachteten 87.8%- bzw. 85.3%igen Körneransatz in der Aequationskreuzung F_1 ♀ × *T. spelta* ♂ bzw. F_1 ♀ × *T. polonicum* ♂ (IV. Mitt.). Auf Grund dieser Aequationskreuzungen mit hohem Kreuzungserfolg weicht die gefundene Häufigkeit der 14- bis 21-chromosomigen Embryosäcke von der theoretischen $(0.5+0.5)^7$ ab (Abb. 1, a und e). Die Schiefheit der gefundenen Häufigkeit wird auf eine Univalentenelimination zurückgeführt. Beim Bastard *T. durum* × *T. vulgare* ist die Elimination deutlich stärker als beim Bastard *T. polonicum* × *T. spelta* (KIHARA, 1924; MATSUMURA, 1939a). Um die Flachheit zu erklären, nehmen wir an, dass die Univalenten nicht rein zufallsmässig, sondern zum Teil gruppenweise nach den Polen verteilt werden (IV. Mitt.).

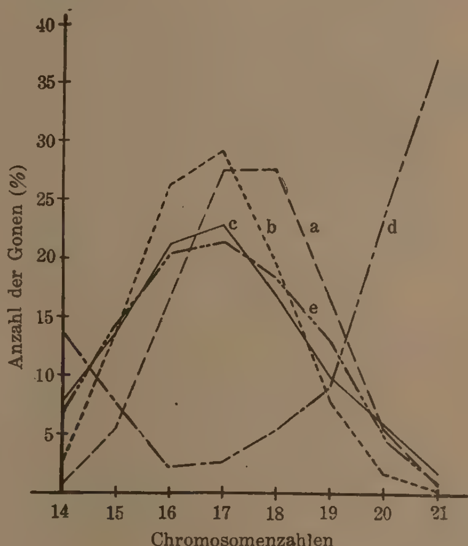


Abb. 1. Theoretische und gefundene Häufigkeit der 14- bis 21-chromosomigen Gonen beim Bastard *T. polonicum* × *T. spelta* in graphischer Darstellung (Nach MATSUMURA, 1939b). a. Theoretische Häufigkeit ohne Univalentenelimination $[(0.5+0.5)^7]$. b. Theoretische Häufigkeit mit mässiger Univalentenelimination $[(0.6+0.4)^7]$. c. Gefundene Häufigkeit in jungen Pollenkörnern (VI. Mitt.). d. Gefundene Häufigkeit der Pollenkörner auf Grund der Zertationskreuzungen mit hohem Kreuzungserfolg (VI. Mitt.). e. Gefundene Häufigkeit der Embryosäcke auf Grund der Aequationskreuzungen mit hohem Kreuzungserfolg (IV. Mitt.).

Die Variationsreihe der in jungen Pollenkörnern festgestellten Chromosomenzahlen stimmt weitgehend mit derjenigen der 14- bis 21-chromosomigen Embryosäcke überein (Abb. 1, c) (VI. Mitt.). Nach den Ergebnissen der Zertationskreuzungen Eltern ♀ × F_1 ♂ spielen aber die 14- und 21-chromosomigen Pollenkörner die weitaus wichtigste Rolle bei der Befruchtung, während die Befruchtungsfähigkeit derjenigen mit intermediären Chromosomenzahlen bedeutend schwächer ist. Ferner sind die höherchromosomigen Pollenkörner tüchtiger als die minderchromosomigen. Abbildung 1, d bringt die Variationskurve der 14- bis 21-chromosomigen Pollen auf Grund der Zertationskreuzung mit hohem Kreuzungserfolg beim Bastard *T. polonicum* × *T. spelta* (im Jahre 1935 der VI. Mitt.). In dieser Verbindung ist die Befruchtungsfähigkeit der 21-

chromosomigen Pollenkörner ungefähr 15 mal so gross wie die der 14-chromosomigen (VI. und X. Mitt.). Dieses Verhältnis des Bastards *T. durum* × *T. vulgare* ist aber nicht so stark wahrnehmbar, dass es beim Bastard *T. polonicum* × *T. spelta* beobachtet wird (IX. Mitt.).

Häufigkeit der verschiedenchromosomigen F_2-Pflanzen

T. polonicum × *T. spelta*

Tabelle 2 bringt den Prozentsatz der 14- bis 21-chromosomigen Embryosäcke bzw. Pollenkörner beim Bastard *T. polonicum* × *T. spelta* auf Grund der Aequationskreuzungen mit hohem Kreuzungserfolg (IV. Mitt.) bzw. der Zertationskreuzungen mit mittelmässigem Kreuzungserfolg (XI. Mitt.). Bei freier Kombinierung der 14- bis 21-chromosomigen Embryosäcke (mit der in Tab. 2 gegebenen Häufigkeit) mit den 14-

TABELLE 2. Prozentsatz der 14- bis 21-chromosomi en Embryosäcke bzw. Pollenkörner beim Bastard *T. polonicum* × *T. spelta* auf Grund der Aequations- bzw. Zertationskreuzungen

	Kreuzung	Chromosomenzahlen							
		14	15	16	17	18	19	20	21
♀	F_1 × Eltern (IV. Mitt.) (vgl. Abb. 1, e)	7.05	14.11	20.13	20.54	18.05	13.69	5.19	1.24
♂	*T. spelta* × F_1 (XI. Mitt.)	8.51	5.67	2.84	2.84	4.25	11.35	25 53	39.01
	T. polonicum × F_1	26.60	8.51	4.26	1.06	6.38	15.96	17.02	20.21
	Zusammenfassung im Verhältnis 2:3	19 37	7.37	3.69	1.77	5.53	14.12	20.42	27.73

bis 21-chromosomigen Pollenkörnern (deren Häufigkeit auf Grund der Zertationskreuzungen mit hohem Kreuzungserfolg aus Abb. 1, d hervorgeht) müssten sich die 28- bis 42-chromosomigen F_2-Zygoten mit der

TABELLE 3. Prozentsatz der 28- bis 42-chromosomigen F_2-Pflanzen des Bastards *T. polonicum* × *T. spelta*

Chromosomenzahlen	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
Beobachtet (V. Mitt.)	2.37	2 67	5.33	5.48	6.96	7.41	7.11	9 93	12.00	11.41	11.11	8.89	6 22	2.37	0.74
Theoretisch a (VI. Mitt.)	0.95	2.44	3.91	4.81	5.18	5.57	6.65	10.10	13.21	14.65	13.25	10.32	6.32	2.19	0.45
Theoretisch b (vgl. Tab. 2)	1 37	3.25	5.20	6.11	6.39	6.87	7.59	10.26	12.45	13 22	11.62	8.60	5.03	1.69	0.35

in der VI. Mitteilung schon berechneten Häufigkeit einstellen (Tab. 3, theoretisch a). Im grossen und ganzen stimmen die theoretischen Zahlenreihen mit der gefundenen Häufigkeit überein.

Der Körneransatz bei diesem F_1-Bastard *T. polonicum* × *T. spelta* (in der V. Mitt.) betrug 44.01%, die Fruchtbarkeit war also nur mittelmässig. Bei der mittelmässigen Fruchtbarkeit des F_1-Bastards erweist es sich für die Bestimmung der Häufigkeit der verschiedenchromosomigen F_2-Pflanzen als ungeeignet, die Resultate der Zertationskreuzungen mit hohem Kreuzungserfolg (im Jahre 1935, VI. Mitt.) für die Festsetzung der Häufigkeit der 14- bis 21-chromosomigen Pollenkörner zu verwenden. Vielmehr müssen wir hier bei den Pollenkörnern die Ergebnisse der Zertationskreuzungen mit mittelmässigem Kreuzungserfolg in der XI. Mitteilung benutzen (Tab. 2.).

Weiter möchten wir versuchen, die verschiedenchromosomigen Eizellen des Bastards in 2 Gruppen einzuteilen, eine mit 14—17, die andere mit 18–21 Chromosomen. Auf Grund der Aequationskreuzungen in der IV. Mitteilung (Abb. 1, e) ergeben sich 298 minderchromosomige und 184 höherchromosomige Eizellen. Ihr Verhältnis ist demnach ungefähr 3:2. Hier können wir F_2-Pflanzen in den Verbindungen von 3 minderchromosomigen Eizellen × F_1 und 2 höherchromosomigen × F_1 unterscheiden. Wenn wir in dem ersteren Fall die Verbindung *T. polonicum* × F_1 und in dem letzteren die Verbindung *T. spelta* × F_1 voraussetzen, so müssten wir als Häufigkeit der verschiedenchromosomigen Pollenkörner die Zahlenreihen auf Grund der Zertationskreuzungen mit mittelmässigem Kreuzungserfolg benutzen, wobei die Ergebnisse der Verbindung *T. polonicum* × F_1 und diejenigen der Verbindung *T. spelta* × F_1 im Verhältnis 3:2 zusammengefasst werden (Tab. 2). Wenn die 14- bis 21-chromosomigen Embryosäcke, deren Häufigkeit aus Tab. 2 hervorgeht, durch die 14- bis 21-chromosomigen Pollenkörner mit der oben berechneten Häufigkeit frei befruchtet werden, müssten die 28- bis 42-chromosomigen F_2-Pflanzen diejenigem der Tabelle 3 (theoretisch b) sein. Die gefundene Häufigkeit stimmt mit dieser theoretischen besser überein, als mit der theoretischen a (Abb. 2).

Die F_2-Körner zeigten ziemlich gute Keimung (84.36%). Im Laufe des Winters sind schwache Keimlinge eingegangen und der Prozentsatz der unter den ausgesäten Körnern überlebenden Pflanzen betrug 74.63% (V. Mitt.). Elimination der zygotischen Kombinationen, ungekeimte Körner und nach der Keimung eingegangene Pflanzen werden auch schon bei den Zertationskreuzungen mit mittelmässigem Kreuzungserfolg bemerkt (VI., VIII. und XI. Mitt.).

Doch muss nun einerseits berücksichtigt werden, dass in F_2 die fertilen und sterilen Chromosomenkombinationen gemischt enthalten sind,

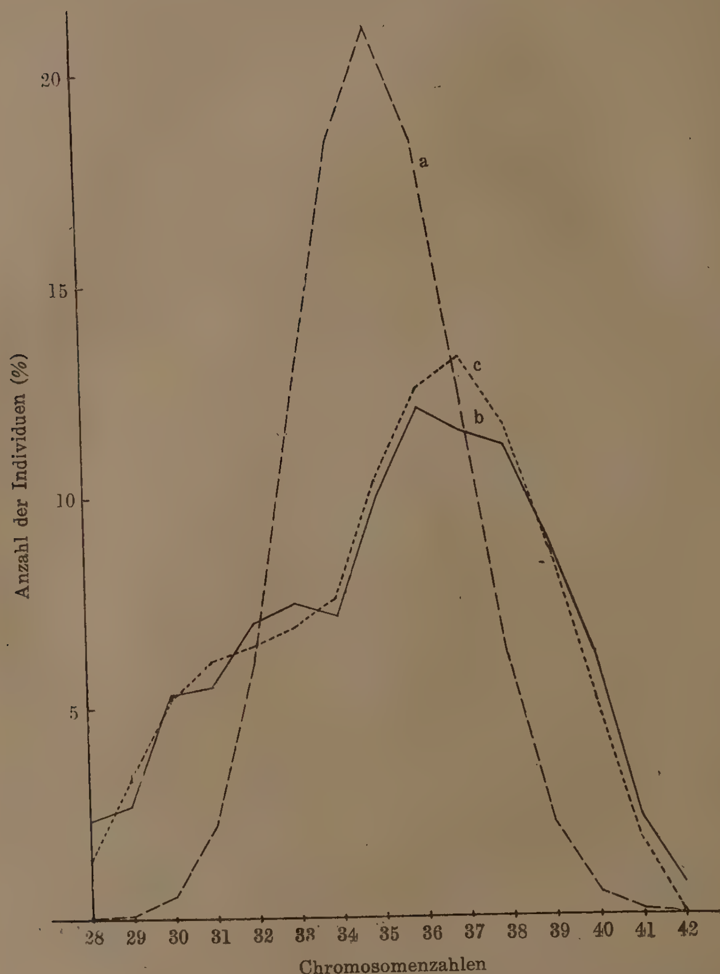


Abb. 2. Theoretische und gefundene Häufigkeit der 28- bis 42-chromosomigen F_2-Individuen beim Bastard *T. polonicum* × *T. spelta* in graphischer Darstellung. a. Theoretische Häufigkeit ohne Univalentenelimination $[(0.5+0.5)^{14}]$. b. Gefundene Häufigkeit. c. Theoretische Häufigkeit (Tab. 3. Theoretisch b).

während in den Rückkreuzungen alle Pflanzen zu den fertilen Kombinationen gehören. Die sterilen Pflanzen sind im allgemeinen merklich weniger lebensfähig als die fertilen. Weil beim Bastard *T. polonicum* × *T. spelta* ziemlich viel sterile Pflanzen beobachtet wurden (KIHARA, 1924,

1932; MORIYA, 1932; MATSUMURA, 1936a), dürfte die zygotische Elimination dieser Pflanzen nicht derart reichlich sein, gegenüber der der Verbindung *T. durum* × *T. vulgare*, dass wir die theoretische Häufigkeit in der Tabelle 3 (theoretisch b) verbessern müssten.

T. durum × *T. vulgare*

Auf die Berechnung der Häufigkeit der 14- bis 21-chromosomigen Embryosäcke auf Grund der Aequationskreuzungen in der IX. Mitteilung müssen wir verzichten, da in diesen Kreuzungen mit mittelmässigem Kreuzungserfolg keine einzige Befruchtung mit einem 21-chromosomigen Pollenschlauch ein entwicklungsfähiges Korn ergeben hatte. Wir haben versucht, die Resultate der Kreuzung F_1 × *T. durum* von YAMASHITA (1937) heranzuziehen (Tab. 4). In diesem Versuch ergaben sich gegen 59 (14–17)-chromosomige Eizellen 24 (18–21)-chromosomige, was ja dem Verhältnis 5:2 ungefähr entspricht. Unter der gleichen Annahme, wie beim Bastard *T. polonicum* × *T. spelta*, wird die Häufigkeit der verschiedenchromosomigen Pollenkörner in Tabelle 4 berechnet, wobei auf Grund der Zertationskreuzungen mit mittelmässigem Kreuzungserfolg in

TABELLE 4. Prozentsatz der 14- bis 21-chromosomigen Embryosäcke bzw. Pollenkörner beim Bastard *T. durum* × *T. vulgare* auf Grund der Aequations- bzw. Zertationskreuzungen

	Kreuzung	Chromosomenzahlen							
		14	15	16	17	18	19	20	21
♀	F_1 × *T. durum* (YAMASHITA, 1937)	10.84	20.48	22.89	16.87	16.87	8.43	2.41	1.21
♂	*T. vulgare* × F_1 (IX. Mitt.)	23.08	11.54	4.81	3.85	6.73	13.46	15.38	21.15
	T. durum × F_1	43.65	13.49	8.73	2.38	2.38	6.35	9.53	13.49
	Zusammenfassung im Verhältnis 2:5	37.78	12.93	7.61	2.80	3.62	8.38	11.20	15.68

TABELLE 5. Prozentsatz der 28- bis 42-chromosomigen F_2-Pflanzen des Bastards *T. durum* × *T. vulgare*

Chromosomenzahlen	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
Beobachtet (MATSUMURA *et al.*, 1939)	5.17	13.79	5.17	8.62	7.76	7.76	7.76	6.04	8.62	12.07	7.76	5.17	2.59	1.72	0.00
Theoretisch (vgl. Tab. 4)	4.10	9.14	12.12	11.20	11.26	8.94	7.52	8.40	8.38	7.36	5.36	3.83	1.69	0.51	0.19

der IX. Mitteilung die Zahlenreihen der Verbindung *T. durum* × F_1 und *T. vulgare* × F_1 im Verhältnis 5:2 zusammengefasst werden.

Bei freier Kombination der 14- bis 21-chromosomigen Embryosäcke mit der in Tabelle 4 gegebenen Häufigkeit und der 14- bis 21-chromosomigen Pollenkörner, deren Häufigkeit auch aus Tabelle 4 hervorgeht, müssten sich die 28- bis 42-chromosomigen F_2-Pflanzen mit den in Tabelle 5 berechneten dimodalen Zahlenreihen in Uebereinstimmung finden (Abb. 3). Bei der gefundenen Häufigkeit liegt eine Mode bei 29 und die zweite

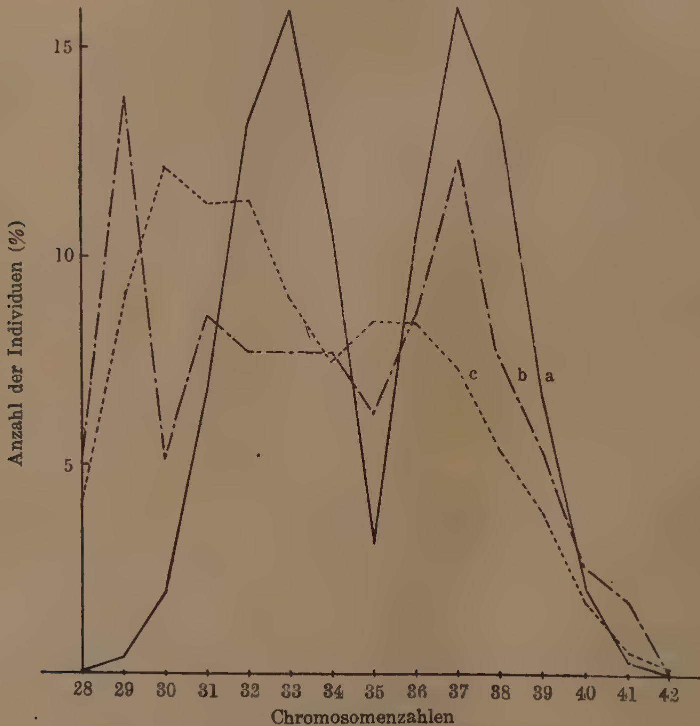


Abb. 3. Theoretische und gefundene Häufigkeit der 28- bis 42-chromosomigen F_2-Individuen beim Bastard *T. durum* × *T. vulgare* in graphischer Darstellung. a. Theoretische Häufigkeit ohne Univalentenelimination (nur „Fertile Kombinationen"). b. Gefundene Häufigkeit c. Theoretische Häufigkeit (Tab. 5).

Mode bei 37. 30-chromosomige Pflanzen treten in etwas geringer Anzahl auf. An diesem Resultat ist die zu geringe Anzahl der untersuchten F_2-Pflanzen schuld. Die erste bzw. zweite Mode der theoretischen Zahlenreihen liegt aber bei 30 bzw. 35.

Dieser F_1-Bastard hatte 37.90%ige Fruchtbarkeit und die F_2-Körner zeigten 69.50%ige Keimung. Viele Keimlinge sind im Laufe des Winters eingegangen und einige waren so wenig lebensfähig, dass die Fixierung der Wurzelspitzen oder der Pollenmutterzellen unmöglich war. Bei nur 50.32% von den ausgesäten Zygoten wurden die Wurzelspitzen oder die Pollenmutterzellen fixiert, um die Chromosomenzahlen zu bestimmen (MATSUMURA *et alii*, 1939). Danach ist die zygotische Elimination der Verbindung *T. durum* × *T. vulgare* merklich stärker als die bei der Verbindung *T. polonicum* × *T. spelta*. Viele Pflanzen mit sterilen Chromosomenkombinationen, die eine grosse Rolle bei einer solchen Elimination spielen, zeigen intermediäre Chromosomenzahlen (±35) (Tab. 1). Wenn wir diese Elimination berücksichtigen, müsste die erste bzw. zweite Mode der theoretischen Häufigkeit auf 29 bzw. 37 (oder 36) übergehen. Die gefundene Häufigkeit stimmt hier mit der theoretischen nach vorgenommener Korrektur gut überein.

Chromosomenzahlen und Fruchtbarkeit in den weiteren Generationen

Die Nachkommen der pentaploiden Bastarde lassen sich nach den Chromosomenkombinationen in zwei Kategorien einteilen, nämlich (1) die der fertilen Kombination und (2) die der sterilen Kombination (KIHARA, 1924; Tab. 2 in der II. Mitt.). Ferner lassen sich bei den Pflanzen mit der fertilen Kombination wieder zwei Gruppen unterscheiden.

(a) Verminderungsgruppe. Die Chromosomenzahl dieser Pflanzen beträgt weniger als 35. Sie vermindert sich alljährlich in den weiteren Generationen, bis sie die konstante Chromosomenzahl 28 erreicht.

(b) Vermehrungsgruppe. Die Chromosomenzahl dieser Pflanzen beträgt mehr als 35. Sie vermehrt sich alljährlich in den weiteren Generationen, bis 42 als konstanter Endwert erreicht wird.

Die Pflanzen mit steriler Chromosomenkombination zeigen sich meistens geschwächt oder völlig steril. Sie gehen im allgemeinen in den späteren Generationen zugrunde, mit Ausnahme der lebensfähigen Zwergpflanzen mit 20_{II}-Chromosomenzahlen. Sonst könnte man Pflanzen mit intermediären Chromosomenzahlen (16_{II}, 17_{II}, 18_{II} and 19_{II}) erhalten.

Bei den fertilen Kombinationen ist die Fertilität von Pflanzen der Verminderungsgruppe ($2n = 28$–34) im allgemeinen niedriger als diejenige der Pflanzen der Vermehrungsgruppe ($2n = 36$–42). Ferner nimmt in der Verminderungsgruppe die Fruchtbarkeit mit der Verminderung der Anzahl der Dinkelchromosomen zu. In der Vermehrungsgruppe geht dagegen die Zunahme der Fruchtbarkeit Hand in Hand mit der

Vermehrung der Chromosomen (KIHARA, 1924; V. und VII. Mitt.). Beim Bastard *T. polonicum* × *T. spelta* konnten wir in der VII. Mitteilung folgende Tatsache betreffs der Fruchtbarkeit der 28- bis 42-chromosomigen Pflanzen feststellen (vgl. Abb. 1 in der VII. Mitt.):

$$28>29>30>31>32>33<34<35 \fallingdotseq 36<37<38<39<40<41<42.$$

Die 28-chromosomigen Pflanzen besitzen eine niedrigere Fertilität als die 42-chromosomigen, die gut fertil oder vollfertil sind, von dem gleichen Fertilitätsgrad wie Dinkelelter. Die 34-chromosomigen sind etwas fertiler als die 33-chromosomigen; noch höher fertil sind die 35-chromosomigen, wo ein vollkommenes D-Genom existiert. Es besteht aber kein grosser Unterschied zwischen der Fertilität der 35- und 36-chromosomigen Pflanzen. Alle 42-chromosomigen Pflanzen haben ein Paar vollständiger D-Genome ausser den 14 A- und B-Chromosomenpaaren, die von beiden Eltern geliefert werden und in verschiedenen Rekombinationen vorkommen. Alle 14 Originalpaare der Genome A und B kommen hier nur selten vor. Bei den meisten 28-chromosomigen Pflanzen liegen verschiedenartige Rekombinationen der Gene vor, was mit der niedrigeren Fruchtbarkeit dieser Gruppe in Zusammenhang stehen dürfte. Die 42-chromosomigen Pflanzen haben dagegen stets das Originalpaar D des Dinkelelters, was ihnen eine gute Fertilität sichert. Dass die Fertilität der 34-chromosomigen Pflanzen höher als die der 33-chromosomigen ist, muss darauf zurückgeführt werden, dass 6 Chromosomen ein fast vollständiges D-Genom ergeben und mit den A- und B-Paaren fast ebensogut zusammenarbeiten wie ein ganzes D-Genom. Die ziemlich hohe Fertilität der konstant 40-chromosomigen Pflanzen, die zu einer sterilen Kombination gehören und denen ein Paar der D-Chromosomen fehlt, sowie die höhere Befruchtungsfähigkeit der 20-chromosomigen Pollenkörner als die der 14-chromosomigen (vgl. VI. Mitt.) stehen mit dieser Annahme in Einklang.

In den weiteren Generationen stellen die 28-chromosomigen Pflanzen die Chromosomenformel des tetraploiden Elters dar, zu der die Pflanzen der Verminderungsgruppe ($2n=29$–34) im Laufe der Generation ziemlich in Eile revertieren. Die 36- bis 41-chromosomigen Pflanzen der Vermehrungsgruppe kehren langsam zu der hexaploiden Formel zurück, die die konstante Chromosomenzahl 42 hat (KIHARA, 1924). Die Untersuchungen von JENKINS und THOMPSON (1930), STEVENSON (1930) MORIYA (1932) und MATSUMURA (1937) bestätigen die Angabe von KIHARA[1].

---

(1) SAPĚHIN (1928) hat einmal die konstant 36-chromosomigen Pflanzen mit $16_{II}+4_{I}$ beobachtet. Nach seiner späteren Erklärung beruht aber diese Beobachtung auf einem Irrtum seinerseits.

Bis jetzt wurden 4 verschiedene Zwergpflanzen mit 20_{II} entdeckt, denen je ein Paar Dinkelchromosomen gefehlt hat. Im Laufe der Jahre traten auch in den Folgegenerationen dieser Zwerge plötzlich Individuen auf, die sich von den Schwesterpflanzen durch normalen Wuchs und volle Fertilität in auffallender Weise unterschieden. Die mikroskopische Untersuchung ergibt 42 somatische bzw. 21 gametische Chromosomen ($19_{II}+1_{IV}$) für diese normalwüchsig und fertil gewordenen Pflanzen. Diese Chromosomenvermehrung beruht auf der Verdoppelung eines bestimmten Chromosoms des A- oder B-Genoms, das bei allen Zwerglinien dem fehlenden Dinkelchromosom entspricht (KIHARA und WAKAKUWA, 1935b; KIHARA, 1939 und unveröffentl.).

Aus unseren Untersuchungen über die pentaploiden Bastarde geht hervor, dass eine vollkommene Balance erst dann erhalten wird, wenn bei allen Pflanzen ein Uebergang in die tetraploide oder hexaploide Chromosomenformel stattgefunden hat. In diesem Endzustand sind sie natürlich fertil und können zytologisch und genetisch konstant bleiben. Dieses Gesetz, dass zuerst von KIHARA (1924) für pentaploide *Triticum*-Bastarde aufgestellt wurde, gilt ganz allgemein für triploide (oder pentaploide usw.) Bastarde mit geschlechtlicher Fortpflanzung. Die gleiche Erscheinung wurde später bei triploidem *Avena*-Bastard (*A. barbata* × *A. strigosa*) von NISHIYAMA (1934), triploidem *Allium*-Bastard von LEVAN (1937), triploidem *Petunia*-Bastard von LEVAN (1937), triploidem *Aegilops*-Bastard (*Ae. cylindrica* × *Ae. caudata*) und pentaploiden Varietätenbastarden (*Ae. triaristata* $4x \times 6x$; *Ae. crassa* $4x \times 6x$) von KIHARA *et alii* (unveröffentl.; vgl KIHARA, 1937 und 1940) usw. beobachtet.

Schlusswort

Für die Häufigkeit der 28- bis 42-chromosomigen F_2-Pflanzen des pentaploiden Bastards ist das Mitwirken folgender Tatsachen stark in Betracht zu ziehen.

1. Aus der Fruchtbarkeit des F_1-Bastards geht hervor, dass ungefähr ein halber oder mehrere Embryosäcke unbefruchtet sind. Von diesen unbefruchteten Embryosäcken sind diejenigen mit intermediären Chromosomenzahlen zahlreich.

2. Die Univalenten werden in der II. Reifungsteilung nicht rein zufallsmässig, sondern zum Teil gruppenweise, d.h. mehrere zusammen, nach den Polen verteilt. Danach treten die beiden euploiden Gameten mit 14 und 21 Chromosomen ziemlich zahlreich auf.

3. Die Univalentenelimination bedingt die Produktion von relativ zahlreicheren minderchromosomigen Gameten des F_1-Bastards und solchen

Pflanzen in F_2. In der Verbindung *T. durum* × *T. vulgare* ist die Elimination deutlich stärker als in der Verbindung *T. polonicum* × *T. spelta*.

4. Aus Zertationskreuzungen hervorgehend, spielen die 14- und 21-chromosomigen Pollenkörner die weitaus wichtigste Rolle bei der Befruchtung, während die Befruchtungsfähigkeit derjenigen mit intermediären Chromosomenzahlen bedeutend schwächer ist. Ferner sind die höherchromosomigen Pollenkörner tüchtiger als die minderchromosomigen, was die Erzeugung von relativ mehr höherchromosomigen Individuen in F_2 bedingen müsste. Dieses Verhältnis ist aber beim Bastard *T. durum* × *T. vulgare* nicht so stark wahrnehmbar, dass es beim Bastard *T. polonicum* × *T. spelta* beobachtet werden konnte.

5. Nach Befruchtung von minderchromosomigen Eizellen durch höherchromosomige Spermakerne erschwert mangelhafte Endospermbildung die Keimung bzw. macht sie unmöglich. Von den ungekeimten Körnern und den im Keimlingsstadium eingegangenen Zygoten muss demnach der überwiegende Teil ±35-chromosomige Embryonen und 3(AB) + (±D) Endospermen enthalten haben.

Für die Häufigkeit der verschiedenchromosomigen F_2-Pflanzen der verschiedenen Bastarde sind hauptsächlich die oben unter 3, 4 und 5 aufgeführten Befunde massgebend. Ausserdem sind noch zwei weitere Faktoren zu berücksichtigen.

6. Die zygotische Elimination der sterilen Chromosomenkombinationen, von denen viele intermediäre Chromosomenzahlen haben, bedingt die Flachheit der Häufigkeit der verschiedenchromosomigen F_2-Pflanzen, besonders in der Verbindung *T. durum* × *T. vulgare*, wo die Häufigkeit dimodal ist.

7. Auch nach den zum Teil unvollkommenen Genomkonstitutionen ist die Keim- sowie Lebensfähigkeit der minderchromosomigen Embryonen geringer als die der höherchromosomigen, besonders in der Verbindung *T. polonicum* × *T. spelta*. Bei der Vermehrungsgruppe mit 36 bis 41 Chromosomen haben die Pflanzen mindestens ein vollkommenes Dinkelgenom, während das D-Genom in der Verminderungsgruppe mit 29 bis 34 Chromosomen unvollständig ist.

8. Die weiteren Untersuchungen über die Chromosomenzahlenschwankung und die Fruchtbarkeit der Nachkommen in den F_2- und Folgegenerationen des pentaploiden Weizenbastards haben folgendes ergeben. Bei den Pflanzen der Vermehrungsgruppe werden die fehlenden Chromosomen des D-Genoms allmählich restituiert, so dass sie im Laufe der Generationen bei der konstanten Chromosomenzahl 42 anlangen, während bei den Pflanzen der Verminderungsgruppe die konstante Zahl 28 durch Verlust der Univalenten erreicht wird. Eine vollkommene Balance wird erst erhalten, wenn alle in $4x$ oder $6x$ übergegangen sind. Dieses Gesetz hat seine grösste Bedeutung für Pflanzen, die ganz auf geschlechtliche Fortpflanzung angewiesen sind, und gilt allgemein für triploide (oder pentaploide) Bastarde.

Zitierte Literatur

JENKINS, J. A. and THOMPSON, W. P. 1930. Chromosome condition in the second and third generations of pentaploid wheat hybrids. Canad. Journ. Res. **2.**

KIHARA, H. 1924. Cytologische und genetische Studien bei wichtigen Getreidearten mit besonderer Rücksicht auf das Verhalten der Chromosomen und die Sterilität in den Bastarden. Mem. Coll. Sci. Kyoto Imp. Univ. B. **1.**

——— 1932. Weitere Untersuchungen über die pentaploiden *Triticum*-Bastarde. II. Japan. Journ. Bot. **6.**

——— 1937. Genomanalyse bei *Triticum* und *Aegilops*. VII. Mem. Coll. Agric. Kyoto Imp. Univ. No. **41.**

——— 1939. Polyploidy in *Triticum*. (Japanisch). Bot. & Zool. **7.**

——— 1940. Verwandtschaft der *Aegilops*-Arten im Lichte der Genomanalyse. Ein Ueberblick. Züchter **12.**

KIHARA, H. und WAKAKUWA, SH. 1935a. Weitere Untersuchungen über die pentaploiden *Triticum*-Bastarde. IV. Japan. Journ. Bot. **7.**

——— und ——— 1935b. Veränderung von Wuchs, Fertilität und Chromosomenzahl in den Folgegenerationen der 40-chromosomigen Zwerge bei Weizen. Japan. Journ. Gen. **11.**

LEVAN, A. 1936. Zytologische Studien an *Allium schoenoprasum*. Hereditas **22.**

——— 1937. Chromosome numbers in *Petunia*. Ibid. **23.**

MATSUMURA, S. 1936a. Weitere Untersuchungen über die pentaploiden *Triticum*-Bastarde. V. Japan. Journ. Bot. **8.**

——— 1936b. Idem. VI. Ibid. **8.**

——— 1936c. Idem. VII. Ibid. **8.**

——— 1937. Zwei unerwartete 36-chromosomige Pflanzen in der Rückkreuzung *T. polonicum* × (*T. polonicum* × *T. Spelta*). Cytologia FUJII-Jubiläumsband.

——— 1938. Weitere Untersuchungen über die pentaploiden *Triticum*-Bastarde. VIII. Japan. Journ. Bot. **9.**

——— 1939a. Idem. IX. Ibid. **9.**

——— 1939b. 20jährige zytogenetische Untersuchung des pentaploiden Weizenbastards zwischen Emmer- und Dinkelreihen. Züchter **11.**

——— 1940a. Weitere Untersuchungen über die pentaploiden *Triticum*-Bastarde. X. Japan. Journ. Bot. **10.**

——— 1940b. Idem. XI. Ibid. **11.**

MATSUMURA, S., MATSUMOTO, K., YAMASHITA, K. und NAKAMURA, Y. 1939. Häufigkeit der verschiedenchromosomigen F_2-Pflanzen bei den pentaploiden Weizenbastarden. Bot. & Zool. **7.**

MORIYA, M. 1932. Chromosomenzahlen und Fertilitätsverhältnisse in der Nachkommenschaft eines hyperpentaploiden *Triticum*-Bastards mit 34 somatischen Chromosomen. Japan. Journ. Gen. **8.**

NISHIYAMA, I. 1934. Chromosome behaviour and its bearing on inheritance in triploid *Avena* hybrids. Mem. Coll. Agric. Kyoto Imp. Univ. No. **32.**

SAPĚHIN, A. A. 1928. Hylogenetic investigation of the *vulgare* group in *Triticum*. Bull. Appl. Bot., Gen. & Plant-Breed. **19.**

STEVENSON, F. 1930. Genetic characters in relation to chromosome numbers in a wheat species cross. Journ. Agric. Res. **41.**

THOMPSON, W. P. 1934. The causes of the cytological results obtained in species crosses in wheat. Canad. Journ. Res. **10.**

YAMASHITA, K. 1937. Genetische Untersuchungen über den Markgehalt der Weizen-Halme. Mem. Coll. Agric. Kyoto Imp. Univ. No. **39.**

Biochemische Studien über die Zellmembran von Braun- und Rotalgen

Von Tomoo MIWA

Mit 5 Textfiguren und 26 Tabellen

(Eingegangen am 3. Juli 1940)

Inhaltsübersicht

Vorbemerkung

Obschon die Zellmembran der höheren Pflanzen in bezug auf sowohl morphologische Struktur als auch chemische Natur entweder rein wissenschaftlich oder aus praktischen Gründen bereits eingehend untersucht worden ist, bleiben unsere Kenntnisse über die der niederen Pflanzen sehr mangelhaft. So sind die Membranstoffe der Algen spärlich und zwar nur fragmentarisch erforscht worden. Die bisherigen Untersuchungen sind zumeist von zwei Seiten durchgeführt worden, nämlich einerseits von den Botanikern und andererseits von den Chemikern. Bei den Forschungen von den Botanikern sind hauptsächlich die mikrochemischen Färbungs- oder Lösungsreaktionen unter dem Mikroskop angewendet worden, während die Untersuchungen von den Chemikern immer auf dem makrochemischen Wege ausgeführt worden sind, indem die Alge meist als ganzes zum chemischen Studium dient. Die mikrochemische Methode ist besonders dazu geeignet, die Lokalisation der einzelnen Bestandteile in der Zellhaut kennen zu lernen, jedoch gibt sie bezüglich der chemischen Natur keinen Aufschluss. Bei den chemischen Methoden ist der Sachverhalt ganz umgekehrt. Während man dadurch die chemische Natur der Algenmembranstoffe feststellen kann, gestattet es jedoch nicht, die Lokalisation derselben klarzulegen. Für den biochemischen Zweck reicht also die rein chemische Methode allein nicht aus. Bei der vorliegenden Arbeit wurden daher die makro- und mikro-chemischen Methoden stets Hand in Hand angewendet.

Da die Algen systematisch recht verschiedene Pflanzengruppen umfassen, so scheint es uns sehr interessant, festzustellen, ob die Membranstoffe auch je nach der systematischen Stellung der Algen verschieden sind oder nicht. Es ist auch von vornherein zu erwarten, dass die im Wasser lebenden Algen charakteristische Membranstoffe führen, die von denen der Landpflanzen verschieden sind. Daher wurde die Beziehung der Membranstoffe der Algen zu denen der höheren Pflanzen stets berücksichtigt. Zieht man ferner die Angabe F. VON WETTSTEINS(1) in Betracht, dass die Verbreitung des Chitins in den Pilzen vom Standpunkt der Pflanzensystematik aus von Bedeutung ist, so erscheint es auch wünschenswert, die chemischen Eigenschaften und die Verbreitung der einzelnen Membranstoffe in den verschiedenen Algen näher zu erforschen.

Die vorliegende Arbeit wurde unter freundlicher Leitung von meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. KEITA SHIBATA an der kaiserlichen Universität zu Tokyo, ausgeführt. An dieser Stelle erlaube ich mir, ihm meinen tiefgefühlten Dank auszusprechen. Auch bin ich Herren

(1) Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien, (1) **130**, 3 (1921).

Proff. K. OKAMURA, Y. YABE, Y. YAMADA, S. UEDA und Dr. C. KANDA für vielseitige Unterstützung und ferner auch Fräulein Dr. A. TOISHI, Herren Dr. S. ENDO und Dr. S. HORI für wohlwollende Behilfe herzens dankbar.

Die vorliegenden Untersuchungen wurden mit Hilfe eines Stipendiums ausgeführt, das die Japan Gesellschaft zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung mir freundlicherweise gewährt hat, wofür ich den Autoritäten der Gesellschaft minen verbindlichsten Dank ausspreche.

I. Die Zellmembran der Braunalgen

1. Einleitung

Bezüglich der Membranstoffe der Braunalgen liegen bis jetzt nur wenige Angaben vor. Heutzutage wissen wir zwar noch nicht mit Sicherheit, ob die bisher erkannten Zellwandbestandteile, wie Cellulose, Algin, Fucin, Fucoidin u.a. als Membranstoffe aller Braunalgen anzusprechen sind und ferner ob sie die ganze Braunalgengruppe hindurch chemisch identisch oder je nach der Art oder der Gattung verschieden sind. Diese Unklarheiten scheinen vor allem davon herzurühren, dass die bisherigen chemischen Untersuchungen zumeist nicht von botanisch-systematischem Standpunkt aus durchgeführt und die mikrochemischen Forschungen, wie oben ausdrücklich betont, nicht mit den rein chemischen Untersuchungen verknüpft worden sind. Deshalb habe ich versucht, (1) die chemische Natur der einzelnen Membranbestandteile festzustellen und deren Verbreitung in Braunalgen zu erforschen und (2) die Lokalisation derselben in der Zellhaut mit Hilfe der mikrochemischen Methoden aufzuklären.

Wie unten ausführlich behandelt, lassen sich die Hauptbestandteile der Membranstoffe der Braunalgen in Cellulose, Alginsäure und Membranschleime einteilen, unter denen die Cellulose und die Alginsäure als allgemeine und wesentliche Membranstoffe betrachtet werden. Der von H. KYLIN[1] Fucoidin benannte Membranschleim, der den Inhalt des Schleimganges darstellt, kommt auch ziemlich weit verbreitet in Phaeophyceen vor, jedoch ist dessen chemische Natur, soweit es aus den vorliegenden Versuchen hervorging, für alle Braunalgen nicht immer gleich, was im Gegensatz zu Cellulose und Alginsäure steht. Daneben finden sich auch die Hemicellulosen, die chemisch sehr mannigfaltig zu sein scheinen. Es wird mit Wahrscheinlichkeit vermutet, dass die folgenden, bei der Säurehydrolyse der Algen hervorgekommenen Zuckerarten, wenigstens zum Teil, von den Hemicellulosen herstammen: Glucose und Fructose aus

(1) Z. physiol. Chem., **83**, 171 (1913); **94**, 337 (1915).

Laminaria (J. KÖNIG u. J. BETTELS[1]) und aus *Macrocystis pyrifera* (D. R. HOAGLAND u. L. LIEB[2]), Arabinose aus *Fucus evanescens* (E. TAKAHASHI[3]), Galaktose aus *Laminaria* (Z. GRUZEWSKA[4], K. ATSUKI u. Y. TOMODA[5]), Mannose aus *Fucus* (R. H. F. MANSKE[6]). Aus dem geringen Gehalt und der wechselnden chemischen Natur ist zu schliessen, dass sie weder als charakteristische noch als wesentliche Membranstoffe der Braunalgen anzusehen sind.

2. Cellulose

a) Allgemeines

Die Forschungen über die Cellulose der Braunalgen gingen auf E. STANFORD[7] zurück, welcher bei den verschiedenen Braunalgen zuerst das Vorkommen der celluloseartigen Substanz beobachtete. Sie wurde aber von diesem Forscher „Algulose" benannt, da er damals glaubte, dass der betreffende Stoff, wegen der schweren Angreifbarkeit durch Mineralsäuren, von der gewöhnlichen Cellulose der höheren Pflanzen verschieden und charakteristisch für die Braunalgen ist, ohne jedoch in die chemische Natur näher eingegangen zu haben.

Etwas später haben J. GRABENDORFER[8] bei *Durvellaea Harveyi* und *Lessonia ovata* und C. SAUVAGEAU[9] bei *Ectocarpus fulvescens* das Vorkommen der Cellulose angegeben, indem die Blaufärbung der Zellhaut mittels Chlorzinkjods beobachtet wurde. Ebenfalls auf dem mikrochemischen Wege berichtete N. WILLE[10], dass die Zellmembran von *Laminaria* aus zwei voneinander verschiedenen Schichten aufgebaut ist, von denen die innere, das Protoplast umgebende Schicht aus Cellulose und die Interzellularsubstanz aus Calciumpektinat bestehen. Mit Hilfe der Färbungsreaktionen mit den Jodreagenzien und der Lösungsprobe mittels des Kupferoxydammoniaks beobachtete C. VAN WISSELINGH[11] bei *Fucus vesiculosus* das Vorkommen der Cellulose. Auf Grund der mikrochemi-

---

(1) Z. Unt. Nahr-. u. Genussm., **10**, 457 (1905).
(2) J. Biol. Chem., **23**, 285 (1915).
(3) J. Fac. Agr. Tohoku Imp. Univ., **6**, 109 (1914).
(4) Compt. rend. Acad. Sci., **173** (2), 52 (1921).
(5) J. Soc. Chem. Ind. Japan, **29**, 509 (1926).
(6) J. Biol. Chem., **86**, 571 (1930).
(7) Chem. News, **47**, 254 (1883).
(8) Bot. Ztg., **43**, 641 (1885).
(9) Compt. rend. Acad. Sci., **122**, 896 (1896).
(10) Festskrift till H. Majestät OSCAR II (1897), zitiert nach H. KYLIN, Z. physiol. Chem., **94**, 337 (1915).
(11) Jahrb. wiss. Bot., **31**, 619 (1898).

schen Untersuchungen teilte H. KYLIN[1] mit, dass die innerste Zellwand verschiedener Braunalgen aus Cellulose besteht, und bestimmte deren Gehalt bei *Ascophyllum nodosum, Fucus vesiculosus, Laminaria saccharina* und L. *digitata* mittels des HENNEBERGschen Verfahrens, woraus sich ergab, dass der Cellulosegehalt der Braunalgen demjenigen der höheren Pflanzen im allgemeinen weit zurücksteht.

Was die chemische Natur der „Algulose" betrifft, so gehen die Meinungen verschiedener Forscher seit E. STANFORD etwas aus einander. Neuerdings haben K. ATSUKI und Y. TOMODA[2] und S. OCHI und T. TAKAHASHI[3] angegeben, dass die Rohfaserpräparate aus *Laminaria* bzw. *Ecklonia cava* nicht als eine echte Cellulose, vielmehr als eine Hemicellulose, angesehen werden sollen, weil sie im Gegensatz zu der eigentlichen Cellulose der höheren Pflanzen sehr leicht im Wasser dispergiert werden können. P. RICARD[4], welcher bei *Laminaria flexicaulis* und *L. saccharina* keine Blaufärbung mit Jod und Schwefelsäure wahrnehmen konnte, bezeichnete auch die Fasersubstanz der Braunalgen Algulose. Kürzlich wurde die Cellulosefrage der Braunalgen von N. G. NAYLOR und B. RUSSELL-WELLS[5] erneut behandelt, woraus sich ergab, dass sich das Vorkommen der echten Cellulose bei *Laminaria saccharina, L. digitata, Fucus vesiculosus, F. serratus, Ascophyllum nodosum* und *Pelvetia canaliculata* durch Blaufärbung mit Jod und Schwefelsäure und Löslichkeit in Kupferamminlösung sowie auch durch Darstellung der chloroformlöslichen Acetylcellulose feststellen liess.

Aus den erwähnten ist zu ersehen, dass der bisherige Nachweis der Cellulose zumeist mit Hilfe der Färbungsreaktionen und der Löslichkeitsverhalten gegenüber Kupferoxydammoniak herbeigeführt worden ist, wobei besonders betont werden soll, dass die Cellulosenatur der Fasersubstanz der Braunalgen von einigen Forschern sogar bezweifelt worden ist. In Anbetracht der Befunde, dass das Amyloid, das Xylan des Bambus-[6] und des Maiskeimlings[7] sowie das der Buchenjungtrieben[8], sich mit den Jodreagenzien ebenfalls blau färben, und dass es auch Hemicellulosen gibt, die in Kupferamminlösung löslich sind, so erscheinen die Färbungs- und Lösungsreaktionen an sich nicht ausreichend, um die Cellulose eindeutig nachzuweisen. Daher scheint es mir wünschenswert, die Cellulosefrage mit der noch sicheren Methode zu entscheiden.

---

(1) Z. physiol. Chem., **83**, 171 (1913); **94**, 335 (1915).
(2) J. Soc. Chem. Ind. Japan, **29**, 509 (1926).
(3) Tokyo Kogyo Sikenzyo Hokoku, **24**, Nr. 7 (1929).
(4) Bull. Soc. Chim. Biol., **13**, 417 (1931).
(5) Ann Bot., **48**, 635 (1934).
(6) M. LÜDTKE in Ann. Chem., **466**, 27 (1928).
(7) K. P. LINK in J. Am. Chem. Soc., **51**, 2506 (1929).
(8) K. HESS, M. LÜDTKE u. H. REIN in Ann. Chem., **466**, 58 (1928).

Der Gehalt an Rohfaser bei Braunalgen ist meist gering, wie aus den folgenden Beispielen ersichtlich.

Rohfaser

Alge	*% des Trockengew.*	*Autor*
Ascophyllum nodosum	1.7	H. KYLIN
Fucus vesiculosus	1.6	„
Laminaria digitata	5.3	„
L. saccharina	4.4	„
L. saccharina	2.8 –10.9	P. RICARD
L. flexicaulis	4.3 – 7.5	„
L. angustata	8.85–18.16	S. OCHI u. T. TAKAHASHI
L. japonica	6.11– 9.11	„
Undaria pinnatifida	5.89–15.15	„
Eisenia bicyclis	3.11–13.25	„
Eisenia bicyclis	4.15–11.06	„
Sargassum Ringgoldianum	14.70–21.77	„

Die höheren Werte der letzten Forschern dürften darauf zurückgeführt werden, dass der Rückstand, der nach dem Ausziehen der Alginsäure zurückbleibt, ohne weiteres als Rohfaser angegeben worden war.

Bei der vorliegenden Arbeit wurde versucht, zunächst die chemische Natur der „Algulose" aus den systematisch verschiedenen Braunalgen festzustellen und deren Gehalt quantitativ zu bestimmen.

b) Qualitativer Nachweis der Cellulose

Zur Isolierung der Cellulose aus dem Thallus ist es wesentlich, die Alginsäure, die quantitativ den wesentlichen Bestandteil der Membranstoffe ausmacht, vollständig zu entfernen.

Die lufttrockne Alge (*Undaria pinnatifida*) wurde mit etwa 10-facher Gewichtsmenge 1-proz. Salzsäure übergossen und übernacht bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nachdem man die Salzsäure durch Abpressen im Tuch und Waschen mit Wasser beseitigt hatte, wurde der Rückstand mehrmals mit 1-proz. Ammoniak ausgezogen, wodurch der Hauptteil der Alginsäure sich entfernen liess. Es wurde mit 1.25-proz. Natronlauge und dann mit 1.25-proz. Salzsäure je 3 Stunden auf dem siedenden Wasserbade erhitzt und völlig mit Wasser gewaschen. Zur Entfärbung des braunen Rückstandes setzte man 0.5-proz. Natriumhypochloritlösung zu und liess 30 Minuten im Dunkel stehen. Danach säuerte man es mit 2-proz. Salzsäure vorsichtig an, wusch mit Wasser aus und behandelte kurz mit 1-proz. Wasserstoffperoxyd zum völligen Beseitigen der Spur von Hypochlorit. Die nahezu farblose Masse wurde mit Wasser gewaschen, mit Äthanol und Äther je 1 Stunde erwärmt und im Exsikkator getrocknet. Es stellte nun grauweisse Substanz vom Aschengehalt 0.84% dar, die löslich in Kupferamminlösung, unlöslich in 10-proz. Natronlauge ist und sich mit Jod und 60-proz. Schwefelsäure tief

blau und mit Chlorzinkjod violett färbt. Bei der Destillation mit 12-proz. Salzsäure lieferte es nur 0.38% Furfurol-phloroglucid.

Hydrolyse

25 g der so gewonnenen Substanz wurden in Mörser möglichst fein zerrieben, mit 75 ccm 72-proz. Schwefelsäure versetzt und bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach 9 Tagen wurde das schwarzbraune Reaktionsprodukt mit Wasser auf 1500 ccm verdünnt und 4-stundenlang auf dem siedenden Wasserbade erhitzt. Man neutralisierte das Hydrolysat mit Barytwasser und dampfte, nach dem Entfärben mit Tierkohle, auf etwa 300 ccm ein. Es war stark reduzierend, aber alle folgende Farbenreaktionen mit dieser Lösung fielen negativ aus: SELIWANOFFsche Reaktion nach Ketose, Phloroglucin- und Orcinreaktion nach Pentose, ROSENTHALERsche Reaktion nach Methylpentose und Naphthoresorcinreaktion nach Uronsäure.

Die Lösung wurde weiter mit Bleiessig gereinigt und nach Entbleien mit Schwefelwasserstoff fast zur Trockne eingedampft und der Rückstand mit heissem 96-proz. Äthanol extrahiert. Das alkoholische Filtrat wurde eingedampft und der resultierende Sirup in Wasser gelöst.

Zu einer Portion dieser Lösung setzte man Phenylhydrazin und Essigsäure hinzu und liess 3.5 Stunden bei Zimmertemperatur stehen, wobei kein schwer lösliches Phenylhydrazon erzeugt wurde. Erst beim Erwärmen auf dem siedenden Wasserbade trat eine reichliche Menge gelber Osazonkrystalle auf, die filtriert, mit kaltem Aceton gewaschen und getrocknet wurden. Sie stellten lange Nadeln dar und schmolzen bei 206°. Somit liegt das Glucosephenylosazon vor.

Eine andere Portion der obigen Lösung wurde gewöhnlicherweise mit Salpetersäure oxydiert, wobei nicht Schleim- sondern Zuckersäure erzeugt wurde, die sich in Form des sauren Kaliumsalzes identifizieren liess.

Aus allen diesen Ergebnissen geht hervor, dass das Vorhandensein der Glucose sicher und das der Mannose, Galaktose, Fructose sowie auch der Pentosen und Methylpentosen zweifelhaft ist.

Acetolyse

Zur eindeutigen Feststellung der Cellulosenatur habe ich die erhaltene Fasersubstanz der Acetolyse unterworfen.

7 g des obigen Produktes wurden mit 60 ccm Acetolysengemisch, bestehend aus 45 ccm Essigsäureanhydrid, 6 ccm konz. Schwefelsäure und 9 ccm Eisessig, versetzt und bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Im Laufe der 8 Tagen scheiden sich Klümpchen der weissen Krystalle in dem dunkelbraunen Reaktionsgemisch aus. Nach weiterem 7-tägigem Aufbewahren wurde das Reaktionsprodukt in Eiswasser, zu dem etwas Natriumbicarbonat zugesetzt war, gegossen. Das ausgeschiedene Produkt wurde filtriert, mit Wasser gewaschen und zweimal aus 75-proz., dann noch

einmal aus 96-proz. Äthanol zu farblosen Nadeln vom Schmelzpunkt 220–221° umkrystallisiert.

Spezifische Drehung:

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{+1.41° \times 100}{3.463 \times 1} = +40.7° \quad \text{(Chloroform).}$$

Die beiden Werte stimmen mit den Konstanten der α-Octacetylcellobiose überein.

Somit steht ausser allem Zweifel fest, dass die „Algulose“ der Braunalgen im wesentlichen der gewöhnlichen Cellulose der höheren Pflanzen gleich ist. Jedoch erwies sich die Cellulose der Braunalgen, wie OCHI und TAKAHASHI bereits beobachtet haben, als stark quellbar in verdünnter Alkalilauge, was vielleicht den Grund dafür darstellt, dass die bisherigen Angaben über den Rohfasergehalt der Braunalgen erhebliche Schwankungen aufzeigten.

Ferner wurde die Cellulose aus den folgenden Algen hergestellt und acetolysiert, wobei ausnahmslos die Octacetylcellobiose isoliert und durch Bestimmung des Schmelzpunktes identifiziert wurde.

Dictyotales:
Padina arborescens
Neurocarpus undulata
Desmarestiales:
*Desmarestia tabacoides**
Punctaliales:
Colpomenia sinuosa
Laminariales:
Laminaria angustata
Eisenia bicyclis
Fucales:
Fucus evanescens
Hijikia fusiforme

* Bei dieser Alge ist es für die Isolierung der Cellulose notwendig, möglichst vom frischen Material auszugehen, da die Zellhaut beim Trocknen an der Luft durch Ausscheidung von starker Schwefelsäure allmählich zerstört wird.

Aus diesen Resultaten kann man mit grosser Wohrscheinlichkeit schliessen, dass die „Algulose“ der ganzen Braunalgen miteinander identisch und von der gewöhnlichen Cellulose chemisch nicht zu unterscheiden ist.

c) Quantitative Bestimmung des Cellulosegehalts

Die Bestimmung der Cellulose erfolgte in grossen Zügen in derselben Weise wie es bei der Isolierung beschriebn ist, mit dem Unterschied, dass die Bleichung fortfällt. Das Produkt wurde auf dem Gooch-Tiegel mit Asbestos filtriert, mit Äthanol und Äther nachgewaschen, bei 105–110° zur Gewichtskonstanz getrocknet und gewogen. Durch Abrauchen wurde

der Aschengehalt ermittelt, der abgezogen wurde. Die Resultate werden in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

TABELLE I Cellulosegehalt der Braunalgen

Alge	Cellulose % d. Trockengew.
Padina arborescens	12.2
Neurocarpus undulata	12.9
Dictyota dichotoma	5.71
Desmarestia tabacoides	6.34
Scytosiphon lomentarius	13.1
Ishige Okamurai	7.92
Colpomenia sinuosa	9.61
Laminaria japonica	4.02–4.71
L. angustata	6 11
Eisenia bicyclis, Stengel	14.3
Eisenia bicyclis, Blatt	10.3
Ecklonia cava	10.1
Undaria pinnatifida, Blatt	3.68
Undaria pinnatifida, Stengel	8.47
Fucus evanescens	4.23–4 80
Hijikia fusiforme	10.1
Sargassum Thunbergii	6.92
S. Ringgoldianum	10.3

Daraus ist zu ersehen, dass der Cellulosegehalt der Braunalgen, in Einklang mit den Angaben der früheren Forscher, meist sehr gering ist. Dabei ist zu bemerken, dass die Cellulose sich in dem steifen Teil der Alge reichlicher als in dem zarten vorfindet, wie es bei *Undaria* und *Eisenia,* wo der Gehalt bei dem Stengel und dem Blatt getrennt bestimmt war, gezeigt wurde.

d) Lokalisation der Cellulose in der Zellhaut

Nachdem es mit Sicherheit bewiesen wurde, dass echte Cellulose auch in den Braunalgen vorkommt, stellte sich die nächste Aufgabe, die Lokalisation derselben in der Zellhaut festzustellen.

Wie bereits erwähnt, haben N. WILLE, C. VAN WISSELINGH und H. KYLIN beobachtet, dass die Cellulose der Braunalgen in demjenigen Anteil der Zellmembran vorkommt, der das Protoplast unmittelbar umgibt. Ich habe selbst die Angaben dieser Forscher bestätigt und gefunden, dass die Cellulose in sehr dünner Schicht die innerste Zellhaut bildet. Es ist aber zu berücksichtigen, dass der mikrochemische Nachweis der Cellulose dieser Algen, vielleicht infolge der grossen Alginsäuremenge sowie auch des geringen Cellulosegehaltes, etwas mit Schwierigkeiten verbunden ist. So ist P. RICARD nicht gelungen, das Vorkommen der Cellulose in den *Laminaria*-Arten mit Hilfe der Jodreagenzien nachzuweisen. Auch hat H. KYLIN auf die Schwierigkeit des Cellulosenachweises mittels Chlorzinkjods hingewiesen. Daher verfuhr ich im folgenden so, dass die Alginsäure, welche die einzelnen Zellen zu dem festen Gewebe verbindet, vorher beseitigt und der Cellulosenachweis an den dadurch voneinander abgetrennten Zellen versucht wurde. Dadurch liess sich die Cellulosehaut deutlich wahrnehmen, die sich mit Chlorzinkjod oder mit Jod und Schwefelsäure prächtig färbt.

Die Schnitte des Thallus wird in 1-proz. Salzsäure 5-minutenlang getränkt, dann mit Wasser gewaschen und auf den Objektträger gebracht. Tropft man darauf 1-proz. Ammoniak zu und beobachtet unter Mikroskop, so bemerkt man sofort, dass die Gewebestruktur infolge der Auflösung der Interzellularsubstanz, der Alginsäure, rasch zerstört wird, und dass die einzelnen Zellen, deren Protoplast nunmehr nur von der dünnen Cellulosehaut umgehüllt wird, voneinander losgetrennt werden. Nachdem man noch 2–3-mal vorsichtig mit Ammoniaklösung und dann mit 1-proz. Essigsäure und Wasser wäscht, werden die Färbungsreaktionen mit den genannten Jodreagenzien ausgeführt.

Von den beiden Membranstoffen, Cellulose und Alginsäure, ist die erstere doppelbrechend, sodass unter gekreuztem Nicol nur die Celluloseschicht hell hervortritt, während der Interzellularraum dunkel bleibt (Fig. 1).

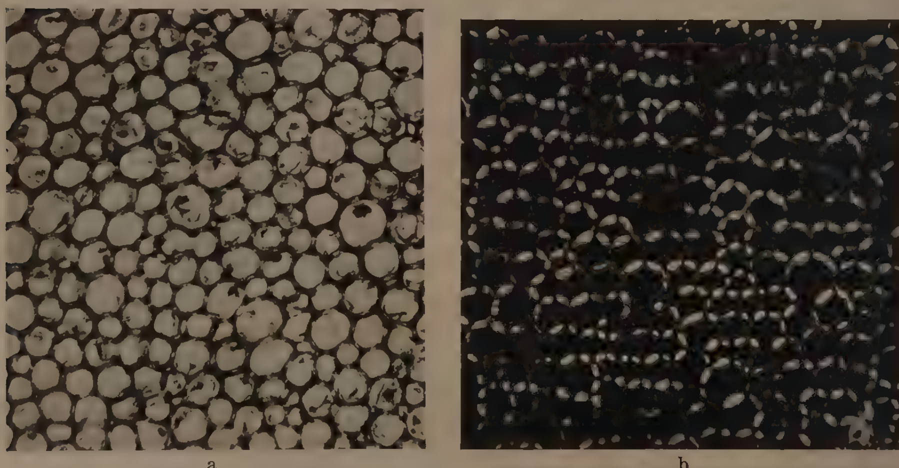


Fig. 1. Querschnitt des Stengels von *Eisenia bicyclis*. a, unter normalem Licht. b, unter gekreuztem Nicol. (× 160)

3. Alginsäure

a) Allgemeines

Wie bereits erwähnt, kommt in den Braunalgen als der zweite Zellwandbestandteil eine eigenartige Interzellularsubstanz vor, welche, der Menge nach, die Cellulose weit übertrifft.

E. STANFORD[1] ist der erste, welcher die aus dem Braunalgen mit verdünnter Sodalösung extrahierbare, schleimige Substanz Algin oder

(1) Chem. News, **47**, 254, 267 (1883).

Alginsäure benannte. Die sogenannte Laminarinsäure von SCHMIEDEBERG[1] sowie auch Tangsäure von KREFTING[2] dürften mit der Alginsäure von STANFORD identisch sein. Indessen ist es aber von keinem dieser Forscher berücksichtigt, von welchem Anteil des Thallus die Alginsäure stammt.

Auf dem mikrochemischen Wege beobachtet C. VAN WISSELINGH[3], dass die Interzellularsubstanz von einer Braunalge, *Fucus vesiculosus*, sich mit Jod und 1-proz. Schwefelsäure blau färbt. Dazu wurde der Name Fucin vorgeschlagen und er nahm an, dass die betreffende Substanz im wesentlichen aus Calciumpektinat besteht.

H. KYLIN[4] teilte die Interzellularsubstanzen der Braunalgen nach dem Färbungsverhalten gegenüber dem VAN WISSELINGHschen Reagens in Algin und Fucin ein, von denen nur das letztere sich damit blau färbt. Nach diesem Autor stellen die beiden Substanzen das Calciumsalz der organischen Säuren, Algin- bzw. Fucinsäure, dar und sie lassen sich voneinander dadurch trennen, dass man zuerst die Alginsäure mit warmem Wasser und dann die Fucinsäure aus dem Rückstand mit verdünnter Natronlauge extrahiert. Aus jeder Fraktion werden die beiden Säuren mit Salzsäure gefällt. Demnach scheint die Alginsäure von STANFORD das Gemisch der beiden Substanzen zu sein. Weiterhin hat er auch die Verbreitung des Fucins mit Hilfe der erwähnten Farbenreaktion untersucht und gefunden, dass es in *Ascophyllum nodosum*, *Chorda filum*, *Fucus serratus*, *F. versiculosus*, *Halidrys siliquosa*, *Laminaria digitata* und *L. saccharina* vorkommt, während es in *Asperococcus bullosus*, *Ectocarpus siliqulosus*, *Elachista fucicola*, *Spermatochnus paradoxus* und *Sphacelaria cirrhosa* fehlt. Daraus hat er den Schluss gezogen, dass das Fucin nur in den derben Algen auftritt und in den zarten fehlt.

Hinsichtlich der chemischen Natur dieser Interzellularsubstanz war damals nichts anders bekannt als dass sie Substanz mit Säurenatur ist. Erst in neuerer Zeit wurde die Frage von mehreren Forschern in Angriff genommen, wodurch die chemischen Eigenschaften in der Hauptsache klargestellt wurden. So haben E. SCHMIDT und F. VOCKE[5] aus *Fucus serratus*, W. L. NELSON und L. H. CRETCHER[6] aus *Macrocystis pyrifera* und *Laminaria Agardhii* und der Verfasser[7] aus *Undaria pinnatifida* diese Substanz nahezu in reinem Zustand isoliert und durch Elementar-

(1) Tageblatt 58 Versamml. Dtsch. Naturforscher u. Ärzte in Strassburg, 1885, zitiert nach H. KYLIN (4).
(2) J. Soc. Chem. Ind., **15**, 720 (1896); **17**, 846 (1898).
(3) Jahrb. wiss. Bot., **31**, 619 (1898).
(4) Z. physiol. Chem., **83**, 171 (1913); **94**, 337 (1915).
(5) Ber. Dtsch. Chem. Ges., **59**, 1585 (1926).
(6) J. Am. Chem. Soc., **51**, 1914 (1929); **52**, 2130 (1930).
(7) J. Chem Soc. Japan, **51**, 738 (1930); Sci. Rep. Tokyo Bunrika Daigaku, (B) **1**, 23 (1932).

analyse, positive Naphthoresorcinreaktion sowie durch Äquivalentbestimmung als ein Polyuronid festgestellt. Auf Grund darauf, dass ein Cinchoninsalz einer Uronsäure vom Schmelzpunkt 204°, der mit dem *d*-glucuronsauren Cinchonins übereinstimmt, bei der Hydrolyse erhalten wurde, haben SCHMIDT und VOCKE geschlossen, dass die betreffende Substanz die Polyglucuronsäure darstellt. Dagegen war es den anderen Forschern nicht gelungen, die Glucuronsäure darin nachzuweisen, sondern sie waren alle darin einig, dass die *d*-Mannuronsäure als Komponente enthalten ist. Ferner haben G. M. BIRD und P. HAAS[1] beobachtet, dass das Product aus einer Art von *Laminaria* auch bei der Hydrolyse *d*-Mannuronsäure liefert.

Angesichts der Frage, ob der Baustein dieses Polyuronids in ganzen Braunalgen derselbe und zwar *d*-Mannuronsäure ist oder ob daneben auch *d*-Glucuronsäure zugegen ist, wie SCHMIDT und VOCKE bei *Fucus serratus* beobachtet haben, habe ich schon damals wahrscheinlich gemacht, dass diese Interzellularsubstanz stets aus derselben Komponente aufgebaut sei, da alle Präparate, die ich aus den systematisch verschiedenen Braunalgen dargestellt hatte, immer *d*-Mannuronsäure bei der Hydrolyse lieferten. Ferner wurde damals gezeigt, dass man bei der milderen Hydrolyse ein höher schmelzendes Cinchoninsalz der Uronsäure (212°)*, das in seinem Schmelzpunkt demjenigen der Glucuronsäure-verbindung (204°) nahesteht und sich als Salz der dimeren Mannuronsäure erwies, erhalten kann. Dies zusammen mit dem Befund, dass die Alginsäure aus *Fucus evanescens*, der Alge von demselben Gattung wie das Ausgangsmaterial von SCHMIDT und VOCKE, ebenfalls aus *d*-Mannuronsäure aufgebaut ist, lässt sich mit grosser Wahrscheinlichkeit vermuten, dass der Baustein der sogenannten Polyglucuronsäure nicht Glucuron- sondern Mannuronsäure sei.

* Der Schmelzpunkt des bei der drastischen Hydrolyse erhältlichen mannuronsuren Cinchonins liegt bei 177°.

b) Beziehung der Algin- zu der Fucinsäure

Wie oben erwähnt, lässt sich nach H. KYLIN die Interzellularsubstanz der Braunalgen in Algin- und Fucinsäure einteilen, von denen die letztere sich durch Blaufärbung mit Jod und 1-proz. Schwefelsäure von der ersteren unterscheidet. Ausserdem gibt es nach diesem Autor auch Unterschied in bezug auf das Drehungsvermögen, wie aus dem folgenden Beispiel ersichtlich.

Präparate aus *Ascophyllum nodosum*.

Alginsäure .... $[\alpha]_D = -136°$.
Fucinsäure .... $[\alpha]_D = -120°$.

(1) Biochem. J., **25**, 403 (1931).

Die Frage, ob die beiden Substanzen im wesentlichen chemisch gleich oder voneinander ganz verschieden sind, ist bis jetzt nicht mit Sicherheit beantwortet worden.

Schon hat der Verfasser[1] angegeben, dass alle Alginsäurepräparate aus *Laminaria japonica, L. angustata, Fucus evanescens* und *Hijikia fusiforme* eine deutliche Färbungsreaktion nach Fucinsäure aufzeigen. Trotzdem wurde daraus durch Hydrolyse immer ganz dasselbe Spaltungsprodukt, *d*-Mannuronsäure, erhalten, wie es aus der Alginsäure von *Undaria pinnatifida,* die keine Fucinreaktion aufweist, produziert wurde. In den Arbeiten von NELSON und CRETCHER sowie von BIRD und HASS ist die Fucinfrage nicht berücksichtigt worden.

Aus meiner eben erwähnten Beobachtung scheint die Annahme naheliegend, dass sowohl die Algin- als auch die Fucinsäure aus demselben Baustein und zwar aus *d*-Mannuronsäure, aufgebaut sei. Jedoch ist die Möglichkeit nicht ausgeschlossen, dass die in jedem Fucinsäurepräparat beigemengte Alginsäure allein für die Bildung der Mannuronsäure verantwortlich ist, weil bei der damaligen Darstellung der Alginsäure das Trennungsverfahren von Algin- und Fucinsäure nicht angewendet wurde. Daher scheint es mir auch wünschenswert, in diese Frage näher einzugehen.

Zunächst wurde versucht, die Algin- und Fucinsäure nach der KYLINschen Methode aus *Laminaria angustata* getrennt darzustellen und die Eigenschaften der beiden Säuren miteinander zu vergleichen.

Wie unten näher beschrieben, zeigt die Zellmembran der Rindenzellen dieser Alge starke Fucinsäurereaktion auf, während die der Markzellen nur eine äusserst schwache gibt. Daher scheint die Alginsäure hauptsächlich in dem letzteren Anteil des Thallus vorzukommen. Die Trennung beider Substanzen wurde folgendermassen vorgenommen.

Die an der Luft getrocknete Alge wurde etwa 1 Stde. in Wasser getränkt, der weich gewordene Thallus mit Messer zu kleinen Stückchen geschnitten und mit Wasser auf dem siedenden Wasserbade extrahiert. Der Auszug wurde durch ein Tuch filtriert (nicht Auspressen!) und der Rückstand der weiteren Extraktion unterworfen. Man wiederholt dieses Verfahren im ganzen 5 Mal und engte die vereinigten Auszüge auf etwa ¼ ihres Volumens ein. Beim Stehen übernacht im Zylindergefäss setzte sich eine geringe Menge von Niederschlag ab, von dem die obere Flüssigkeit durch Abheben getrennt wurde. Zu der klaren Flüssigkeit wurde verdünnte Salzsäure zu etwa 1-proz. zugesetzt, der entstandene Niederschlag im Koliertuch unter Zusatz von Äthanol gepresst und der Rückstand in 1-proz. Ammoniak gelöst. Die noch schwach getrübte Lösung

(1) Bot. Mag., Japan, **46**, 339 (1932).

wurde auf der Zentrifuge geklärt und daraus die Alginsäure durch Fällen mit Salzsäure, Entwässern mit Äthanol und Äther zur Trockensubstanz übergeführt (Präparat I). Aus dem Rückstand des Wasserauszugs wurde die Fucinsäure in derselben Weise, wie bei der Darstellung der Alginsäure aus *Undaria pinnatifida*, hergestellt, nur mit dem Unterschied, dass das Erwärmen der ammoniakalischen Lösung mit Tierkohle und die Behandlung mit salzsäurehaltigem Alkohol ausblieben (Präparat II).

Eine Portion des Praparats II, das eine ziemlich starke Fucinsäurereaktion aufzeigt, wurde 1-stundenlang mit Wasser gekocht, wodurch die genannte Reaktion etwas abgeschwächt wurde (Präparat III). Eine andere Portion des Präparats II wurde 3-stundenlang mit 80-proz. Äthanol, dem Salzsäure zu 1-proz. zugesetzt war, erwärmt, wodurch die Fucinsäurereaktion völlig verschwand (Präparat IV).

Hierbei ist zu bemerken, dass solche Veränderung der Fucinsäurereaktion fast ohne Substanzverlust und unter Bildung nur äusserst geringer Menge reduzierender Substanz vorsichgeht. Vergleichsweise wurde auch ein Präparat ohne vorausgehende Extraktion der Alginsäure hrgestellt (Präparat V).

Beim Trocknen bei 118° im ABDERHALDENschen Apparat färben sich Präparate I, II, III und V mehr oder weniger braungelb, während Präparat IV und die Alginsäure aus *Undaria* keine Verfärbung erleiden.

An jedem Präparat habe ich das Drehungsvermögen und das Äquivalentgewicht durch Titration mit Alkali bestimmt, woraus sich folgende Resultate ergaben.

TABELLE II

Präparat aus	Fucinsäurereaktion	$[\alpha]_D^*$	Äquiv.-gew.
Laminaria I	—	−129.1°	185.1
Laminaria II	++	−132.6°	183.2
Laminaria III	+	−134.8°	180.6
Laminaria IV	—	−132.6°	179.8
Laminaria V	+++	−135.6°	182.3
Undaria	—	−133.1°	177–179

* Zur Bestimmung der spezifischen Drehung wurde die Substanz als Natriumsalz gelöst. (C = 1.3—1.5).

Daraus ist zu ersehen, dass das Drehungsvermögen bei allen Präparaten, innerhalb der Fehlergrenzen, fast gleich gross ist. Besonders scheint es bemerkenswert, dass die Behandlung des Fucinsäurepräparats mit salzsaurem Alkohol, wodurch die charakteristische Fucinsäurereaktion zum Verschwinden gebracht wird, das Drehungsvermögen kaum

beeinflusst. Somit konnte die Angabe KYLINs, dass die Fucinsäure schwächer linksdrehend ist als die Alginsäure, nicht bestätigt werden.

Ausserdem ist es auch bemerkenswert, dass die Fucinsäurereaktion bei dem Präparat V, das ohne Erwärmen hergestellt wurde, am stärksten ist und mit der Zunahme der Erwärmungsdauer (Präparat II und III) verringert wird.

Aus den gefundenen Werten des Äquivalentgewichts, die miteinander annähernd gleich gross sind und dem theoretischen Wert des Uronsäureanhydrids (176) nahe stehen, erscheint die Annahme naheliegend, dass sowohl die Algin- wie auch die Fucinsäure ausschliesslich aus Uronsäure aufgebaut sei. Deshalb habe ich versucht, die Hydrolysenprodukt der Algin- (Präparat I) und der Fucinsäure (Präparat II) vergleichend zu untersuchen.

Je 25 g jedes Präparats wurden unter genau denselben Bedingungen wie bei der Hydrolyse der Alginsäure von *Undaria pinnatifida* hydrolysiert, woraus das Cinchonin- und das Brucinsalz der Uronsäure hergestellt wurden. In der folgenden Tabelle werden die Eigenschaften beider Salze zusammengestellt, die in jeder Hinsicht mit denen der aus der *Undaria*-Alginsäure hergestellten mannuronsauren Salze übereinstimmen.

TABELLE III

		Präparat I (Alginsäure)	Präparat II (Fucinsäure)
Cinchoninsalz	$[\alpha]_D^{22}$	−127.2°	−129.2°
	Schmp.	175—176°	174°
Brucinsalz	$[\alpha]_D^{22}$	−24.6°	−25.4°
	Schmp.	173°	175°

Um festzustellen, ob auch andere Uronsäure als *d*-Mannuronsäure sich am Aufbau der Algin- bzw. Fucinsäure beteiligt oder nicht, wurde folgendes ausgeführt.

Die Mutterlauge aus dem Krystallisat von Cinchoninsalz wurde sorgfältig mit Baryltauge versetzt, um das Cinchonin zu entfernen. Das ausgefällte Cinchonin wurde abfiltriert und das schwach alkalische Filtrat mehrmals mit Chloroform ausgeschüttelt. Aus der wässrigen Lösung wurde das Barium mit einer berechneten Menge 0.5 *n*-Schwefelsäure quantitativ beseitigt und das Filtrat unter vermindertem Druck eingedampft. Der resultierende Sirup wurde in absolutem Äthanol

aufgenommen und die entstandene schwache Trübung durch eine dünne Schicht von Kieselgur geklärt. Das Filtrat wurde zur Trockne verdampft und der Rückstand in wenig Wasser gelöst.

Zur Prüfung auf Galakturonsäure wurde die EHRLICHsche „Bleiessigreaktion“[1] angewendet. Da sowohl die Glucuron- als auch die Mannuronsäure wie ich selbst geprüft habe, unter den eingehaltenen Bedingungen keine charakteristische Rotfärbung zeigen, so darf diese Reaktion als spezifisch für Galakturonsäure betrachtet werden. Die beiden, aus der Mutterlauge von Cinchoninsalz wiedergewonnenen Uronsäurelösungen gaben keine positive Bleiessigreaktion, was auf das Fehlen der Galakturonsäure hindeutet.

Der Rest der Lösung wurde nach HUDSON und ISBELL[2] mit Brom oxydiert. Zu 20 ccm der Lösung, die aus dem Hydrolysat von Fucinsäure (Präparat II) hervorging und etwa 1.2 g Uronsäure enthielt, wurden 2 ccm Brom, 10 g Bariumbenzoat und 15 ccm Wasser zugesetzt und unter gelegentlichem Schütteln bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Nach Einwirkungsdauer von 5 Tagen wurde der Überschuss von Brom durch Luftstrom getrieben und das Barium mit 0.5 n-Schwefelsäure quantitativ entfernt. Aus der von Bariumsulfat und Benzoesäure abfiltrierten Lösung wurde der Bromwasserstoff zuerst mit Bleicarbonat und dann mit Silbercarbonat beseitigt. Die mittels Schwefelwasserstoffs von Blei und Silber befreite Lösung wurde zum Sirup eingedampft. Setzt man zu einer Portion konzentriertes Ammoniak zu und reibt mit einem Glasstab an, so treten bald kleine, rohmbische Krystalle auf, die, nach Waschen mit Wasser und Alkohol bei 187–8° schmolzen. Also ist es nichts anders als das Diamid der Mannozuckersäure. Der Rest des Sirups wurde in 5 ccm Wasser gelöst, mit festem Kaliumcarbonat neutralisiert und dann mit Essigsäure angesäuert. Nach Eindampfen und Aufbewahren im Eisschrank wurden keine charakteristische Krystalle von Monokaliumsaccharat erzeugt.

Die Restlösung aus dem Hydrolysat der Alginsäure (Präparat II), die nach der Gewinnung des Cinchoninsalzes zurückbleibt, wurde ganz in derselben Weise verarbeitet, wobei weder die Glucuron- noch die Galakturonsäure, sondern immer nur die Mannuronsäure durch Isolierung des Mannozuckersäurediamids nachgewiesen wurde.

Obschon damit die Gegenwart der anderen, bisher bekannten Uronsäuren als d-Mannuronsäure in dem obigen Hydrolysat von Algin- und der Fucinsäure ausgeschlossen zu sein scheint, so bleibt noch die Frage offen, ob die Mannuronsäure den einzigen Baustein der Algin- und der Fucinsäure darstelle, wenn man die Tatsache in Betracht zieht, dass die

(1) Ber. Dtsch. Chem. Ges., **65**, 352 (1932).
(2) J. Am. Chem. Soc., **51**, 2225 (1929).

Hydrolyse dieser Säuren so schwer durchführbar ist, dass die Totalspaltung bis jetzt nicht erzielt werden kann. Daher wurde der Rückstand, der nach der Hydrolyse der Algin- bzw. Fucinsäure zurückgeblieben war, näher erforscht.

Der stark braune Rückstand wurde durch mehrmaliges Umfällen aus der ammoniakalischen Lösung mit Salzsäure zum schneeweissen Pulver gereinigt. Das Produkt ist nicht reduzierend und klar löslich in Alkali, wobei die Viscosität der Lösung im Vergleich mit der des Ausgangsmaterials stark vermindert wurde. Bei dem Rückstand aus der Fucinsäure ist die charakteristische Färbung mit Jod und 1-proz. Schwefelsäure nicht mehr wahrzunehmen. An jedem Präparat wurden einerseits die spezifische Drehung und das Äquivalentgewicht bestimmt, und andererseits die chemische Natur des Hydrolysenproduktes erforscht. Je 2 g der Substanz wurden mit 8 ccm 70-proz. Schwefelsäure durchgemischt und 5-tagelang bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Darnach wurde das schwarzbraune Reaktionsprodukt mit 120 ccm Wasser verdünnt und 60-minutenlang zum gelinden Sieden gehalten. Daraus wurde die Uronsäure gewöhnlicherweise in Form des Cinchonin- und Brucinsalzes isoliert. Durch Bestimmung des Schmelzpunktes wurde festgestellt, dass die gebildete Uronsäure *d*-Mannuronsäure ist. Die Ergebnisse der obigen Versuche werden in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

TABELLE IV

Herkunft des Rückstandes	$[\alpha]_D^{20}$	Äquivalent-gewicht	Schmelzpunkt	
			Cinchoninsalz	Brucinsalz
Fucinsäure	−126.9°	208	174°	174°
Alginsäure	−125.4°	212	173°	—

Hierbei soll auch bemerkt werden, dass jeder Hydrolyserückstand im Vergleich mit seiner Muttersubstanz einen geringen Unterschied aufweist, indem der Wert der spezifischen Drehung etwas niedriger und der des Äquivalentgewichts ein wenig höher gefunden wurde. Worauf dieser Sachverhalt beruht, bleibt vorläufig noch nicht festgestellt.

Jedenfalls besteht zwischen den Hydrolyserückstanden, von denen der eine von der Fucin- und der andere von der Alginsäure stammten, kein nennenswerter Unterschied in bezug auf sowohl spezifische Drehung als auch das Äquivalentgewicht.

Die Resultaten der geschilderten Versuche lassen sich folgendermassen zusammenfassen.

1) Der Baustein der Algin- und der Fucinsäure ist derselbe und zwar *d*-Mannuronsäure.

2) Bezüglich des Drehungsvermögens und des Äquivalentgewichts gibt es kein Unterschied zwischen der Algin- und der Fucinsäure.

3) Die charakteristische Farbenreaktion der Fucinsäure wird sehr leicht, wie durch kurzes Erwärmen mit Wasser oder mit salzsaurem Alkohol, zum Abschwächen bzw. Verschwinden gebracht, wobei sich das resultierende Produkt in jeder Hinsicht von der eigentlichen Alginsäure kaum unterscheiden lässt.

Für die Deutung des Unterschieds der Algin- von der Fucinsäure halte ich folgende Alternativen für möglich.

1) Die Fucinsäure setzt sich zusammen aus einer grossen Menge der Alginsäure und einer sehr geringen Menge einer Substanz, die für Blaufärbung mit Jod und 1-proz. Schwefelsäure verantwortlich ist.

2) Der Unterschied liegt in dem Polymerisationsgrad beider Substanzen, indem die Fucinsäure höher polymerisiert ist als die Alginsäure.

In Anbetracht des Befundes, dass die Fucinsäurereaktion durch diejenige Behandlung zum Verschwinden gebracht wird, die für Polysaccharide depolymerisierend wirkt, scheint die Annahme vielmehr naheliegend, dass die letztere Alternative zu Recht besteht.

Allerdings scheint es mir nicht zu zweifeln, dass es zwischen der Algin- und der Fucinsäure kein grundlegender Unterschied liegt. Demnach wäre es bequemer, die Algin- und die Fucinsäure unter den Namen „Alginsäure“ zusammenzufassen, wobei die Fucinsäure als einer Modifikation der Alginsäure aufgefasst wird.

Verbreitung der Fucinsäure in den Braunalgen

Mit Hilfe der erwähnten Färbungsreaktion habe ich die Verbreitung der Fucinsäure mikrochemisch untersucht. Dazu ist nötig, diese Reaktion an dem möglichst frischen Material der Algen zu prüfen, da es andererseits gezeigt worden ist, dass die Thallusstücke von *Eisenia bicyclis* und *Hijikia fusiforme*, die sonst eine positive Reaktion geben würde, beim 2-jährigen Aufbewahren in Alkohol die Eigenschaft einbüsst, sich mit Jod und 1-proz. Schwefelsäure blau zu färben. Deshalb wurde zu dem vorliegenden Versuch immer nur die frischen oder die kurz vor dem Prüfen aus dem Meer herausgenommenen, getrockneten Algen herangezogen.

Daraus ergibt sich, dass diese Reaktion nicht nur je nach der Art der Algen sondern auch je nach dem Gewebe ein und derselben Species verschieden ausfällt, wie aus der folgenden Tabelle ersichtlich.

Tabelle V
Fucinsäurereaktion des Thallus (— positiv, — negativ)

Alge	
Dictyotales	
Neurocarpus undulata, Stengel	—
Neurocarpus undulata, Blatt	—
Padina arborescens	+
Petrospongium rugosum	—
Zonaria Diesingiana	—
Dictyota dichotoma	+
Pachydictyon coriaceum	+
Chordariales	
Eudesme crassa	—
Desmarestiales	
Desmarestia tabacoides[1]	+
D. viridis[2]	—
D. ligulata[2]	—
Punctariales	
Myelophycus caespitosus	—
Scytosiphon lomentarius	—
Colpomenia sinuosa	+
Hydroclathrus clathratus	+
Endarachne Binghamiae	+
Ishige Okamurai[3]	+
I. foliacea	+
Laminariales	
Laminaria angustata, Rinde	+
Laminaria angustata, Mark	±
L. japonica, Rinde	+
L. japonica, Mark	±
Eisenia bicyclis	+
Ecklonia cava	+
E. kurome	+
Undaria pinnatifida, vegetatives Blatt	—
Undaria pinnatifida, Fruchtblatt	+
Fucales	
Fucus evanescens[4]	+
Hijikia fusiforme	+
Sargassum Horneri	+
S. Ringgoldianum	+
S. Thunbergii	+
S. hemiphyllum	+

Anmerkung zur Tabelle V:

(1) Der frische Thallus zeigt starke Reaktion, während das aus der getrockneten Alge dargestellte Alginsäurepräparat keine Blaufärbung gibt.
(2) Gealtertes Trockenmaterial.
(3) In meinem früheren Versuch [Bot. Mag. Tokyo, **46**, 339 (1932)] wurde keine positive Reaktion wahrgenommen. Beim Nachprüfen mit dem frischen Material konnte dagegen deutliche Blaufärbung erzielt werden.
(4) Bei dem jungen Thallus ist die positive Reaktion nur auf die peripheren Gewebe beschränkt.

Beim Überblick über diese Resultate kann man eine Tendenz wahrnehmen, dass die Fucinsäurereaktion manchmal bei den zarten Geweben ausbleibt, wie es bei dem Mark von *Laminaria* und *Fucus* sowie bei dem vegetativen Organ von *Undaria pinnatifida* der Fall ist. Dies stimmt mit dem KYLINschen Befund überein, dass die Fucinsäure meist in den derben Algen vorkommt.

Kürzlich wurde diese Färbungsreaktion an den verschiedenen Präparaten der Alginsäure von T. TAKAHASHI(1) untersucht, woraus sich ergab, dass die Reaktion nicht nur nach der Art der Algen sondern auch nach Darstellungverfahren verschieden ausfällt.

c) Alginsäuregehalt der Braunalgen

Wie bereits erwähnt, stellt die Alginsäure zusammen mit der Cellulose den wichtigsten Zellhautbestandteil der Braunalgen dar, wo sie, der Menge nach, die Cellulose meist weit übertrifft.

An den zahlreichen einheimischen Braunalgen wurde die Alginsäure von OCHI und TAKAHASHI(2) quantitativ bestimmt, wonach der Alginsäuregehalt zwischen 3.06% (*Colpomenia sinuosa*) und 37.25% (*Alaria crassifolia*) schwankt und die Algen mit dem Gehalt von 20–25% überwiegend sind.

Da aber die Versuchsmaterialien dieser Autoren nicht immer frisch waren und einige, an die Küste getriebene, verfaulende Algen sogar auch zur Bestimmung mit herangezogen wurden, so habe ich auch den Alginsäuregehalt von einigen möglichst frischen Algen ermittelt. Die Anwendung des frischen Materials ist deshalb notwendig, weil die Alginsäure beim Eintritt der Fäulnis in wasserlösliche Form umgewandelt wird.

Bei der vorliegenden Arbeit wurde die Bestimmung folgendermassen durchgeführt. Die frisch aus dem Meer geernteten Algen wurden an der Luft getrocknet und 1–3 g davon mit 30-facher Menge 1-proz. Salzsäure übergossen und übernacht bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Danach

---

(1) Tokyo Kogyo Sikenzyo Hokoku, **32**, Nr. 8 (1937).
(2) Ebenda, **28**, Nr. 4 (1933).

wird die Salzsäure abgelaufen und der Rückstand mit Wasser gewaschen und 6-mal mit 1-proz. Ammoniak bei Zimmertemperatur je 1-taglang extrahiert. Aus den vereinigten Auszügen wird die Alginsäure durch Zusatz verdünnter Salzsäure gefällt, auf dem kleinen Koliertuch filtriert, abgepresst und sorgfältig in 50 ccm 65-proz. Äthanol, dem die Salzsäure zu 1-proz. zugesetzt ist, eingetragen. Nach 3–5-stündigem Aufbewahren wird die Alginsäure mit dem Koliertuch gepresst, mit 65–proz. Äthanol zur Chlorfreiheit gewaschen und 30–40-minutenlang mit 96-proz. Äthanol gekocht. Das Produkt wird dann auf dem gewogenen Gooch-Tiegel filtriert, bei 108–112° zur Gewichtskonstanz getrocknet und gewogen. An einer anderen Portion wird das Trockengewicht jeder lufttrockenen Alge ermittelt.

Es wurde schon bei *Undaria pinnatifida* beobachtet[1], das der Cellulosegehalt der Braunalgen in dem steifen Gewebe (Stengel) erheblich grösser ist als in dem weichen. In folgenden wurde der Alginsäuregehalt von Blatt und Stengel ein und derselben Alge miteinnder verglichen. Als Versuchsobjekt dienten *Undaria pinnatifida* und *Eisenia bicyclis*.

Daraus ist ersichtlich, dass der Alginsäuregehalt zwischen den zarten und den derben Geweben keinen wesentlichen Unterschied aufzeigt.

TABELLE VI
Alginsäuregehalt der Braunalgen
(% bezogen auf Trockensubstanz)

Padina arborescens	22.1
Dictyota dichotoma	24.4
Desmarestia tabacoides	18.6
Myelophycus caespitosus	10.1
Colpomenia sinuosa	12 7
Hydroclathrus clathratus	17.5
Ishige Okamurai	25 3
I. foliacea	27.1
*Laminaria angustata**	32.5
*L. japonica**	37.1
Eisenia bicyclis	34.3
Ecklonia cava	35.8
Undaria pinnatifida	38.0
*Fucus evanescens**	26.8
Hijikia fusiforme	18.6
Sargassum Ringgoldianum	29.5
S. Thunbergii	16.8

* Diese Versuchsmaterialien wurden in getrocknetem Zustand zur Verfügung gestellt.

TABELLE VII
Alginsäuregehalt von Blatt and Stengel
(% bezogen auf Trockensubstanz)

Alge	Blatt	Stengel
Undaria pinnatifida	38.7	37.2
Eisenia bicyclis	33 1	35.4

d) Zustand der Alginsäure in der Zellmembran

Wie eingangs erwähnt, bleibt die Frage bis jetzt noch offen, in welcher Form die Alginsäure die feste Zellmembran der Braunalgen

(1) T. MIWA in Bot Mag. Japan, **46**, 339 (1932).

aufbaut.

Schon gab N. WILLE[1] an, dass die Interzellularsubstanz von Laminariaceen aus Calciumpektinat besteht. Auf Grund der Beobachtung, dass sich das Calcium in der Zellmembran der Braunalgen nachweisen liess, hat H. KYLIN[2] geschlossen, dass die Algin- und Fucinsäure in Form des unlöslichen Calciumsalzes in der Mittellamelle der Zellhaut vorkommen.

Hingegen wurde der Versuch von G. M. BIRD und P. HASS[3] zu dem anderen Resultat geführt. Diese Autoren haben bei *Laminaria* sp. gezeigt, dass der Alginsäuregehalt dieser Alge 60% der Trockensubstanz beträgt, der für das neutrale Calciumalginat [$(C_6H_7O_6)_2Ca$] den Calciumgehalt von 5.1% in Anspruch nimmt, während die direkte Bestimmung nur 1.99% von Calcium ergibt. Daraus wurde geschlossen, dass ein grosser Teil der Alginsäure sich in anderer Form als das Calciumsalz befinden muss. Daneben ist die Tatsache, dass die Alginsäure sich auch ohne Vorbehandlung mit Salzsäure mit Sodalösung aus der Alge extrahieren lässt, als Stütze für die obige Schlussfolgerung angeführt worden.

Es ist von vornherein mit Wahrscheinlichkeit anzunehmen, dass die Alginsäure in der festen Zellhaut meist in schwerlöslicher Form vorliegt. Hierbei ist auch in Betracht zu ziehen, dass das Lebensmedium aller Braunalgen immer das Meerwasser ist.

Unter den Metallsalzen der Alginsäure sind nur das Alkali- und das Magnesiumsalz als wasserlöslich erkannt. Wie unten näher dargelegt, habe ich den Befund KYLINS, dass das Calciumsalz der Alginsäure in der Zellhaut vorkommt, bestätigt und gefunden, dass dieses Metall für die Beständigkeit der Zellhautstruktur von wesentlicher Bedeutung ist.[4]

In Anbetracht der Tatsache, dass die Pektinsäure der höheren Pflanzen teilweise in Form des Calcium- und Magnesiumsalzes vorkommt[5] und dass diese beiden Metalle sich auch in den Braunalgen in der Zellhaut mikrochemisch nachweisen lassen, scheint es mir benötigt, den Gehalt dieser Metalle zusammen mit dem der Alginsäure zu bestimmen.

10–15 g der völlig getrockneten, von den anhaftenden Kalksubstanzen (kleine Muscheln, Bryozoeen u.a.) sorgfältig befreiten Alge werden mit etwa 20-facher Menge 2.5-proz. Salzsäure auf dem siedenden Wasserbade 4-mal je 30-minutenlang ausgezogen. An den vereinigten Auszügen bestimmt man das Calcium als Calciumoxalat und das Magnesium als Ammoniummagnesiumphosphat.

---

(1) Festskrift till H. Majestät OSCAR II (1897), zitiert nach H. KYLIN (2).
(2) Z. physiol. Chem., **94**, 335 (1915).
(3) Biochem. J., **25**, 403 (1931).
(4) Bot. Mag. Japan, **46**, 339 (1932).
(5) F. EHRLICH in KLEINS Handb. d. Pflanzenanal., III, **1**, S. 80 (1932).

In der folgenden Tabelle werden die Resultate der Bestimmung zusammengestellt. Vergleichsweise wurde dazu die Alginsäuremenge beigefügt, die unter Annahme, dass die Gesamtmenge dieser Metalle an Alginsäure gebunden ist, berechnet wurde.

TABELLE VIII

Gehalt an Ca, Mg und Alginsäure bei verschiedenen Braunalgen (%)

Alge	Ca	Alginsäure gebunden an Ca, berechnet	Mg	Alginsäure gebunden an Mg, berechnet	Alginsäure gebunden an Ca+Mg, berechnet	Alginsäure gefunden	Differenz
Padina arborescens	2.48	21.8	0.75	10.9	32.7	22.1	—10.6
Laminaria angustata	1.15	10.1	0.29	4.2	14.3	32.5	—18.2
Eisenia bicyclis	0.77	6.8	0.36	5.7	12.5	34.3	—21.8
Undaria pinnatifida	1.56	13.7	0.31	4.5	18.2	39.1	—20.9
Fucus evanescens	1.14	10.0	0.43	6.2	16.2	26.8	—10.6
Sargassum Ringgoldianum	1.62	14.3	0.09	1.3	15.6	29.5	—13.9

Daraus geht mit Sicherheit hervor, dass der Calciumgehalt aller untersuchten Algen, mit einer einzigen Ausnahme von *Padina arborescens*, nicht ausreicht, um die gesamte Alginsäure zu binden. Da es auch andererseits wahrscheinlich erscheint, dass das Calcium in anderer Verbindung als Alginat vorkommt, so wäre die mit der Alginsäure gebundene Calciummenge noch geringer. Mithin ist die KYLINsche Theorie, dass die Algin- und die Fucinsäure in Form des Calciumsalzes vorliegen, nicht mehr aufrechtzuhalten.

Der Magnesiumgehalt der untersuchten Algen ist auch zu gering, um denjenigen Anteil der Alginsäure zu binden, der an Calcium nicht gebunden ist.

Somit haben die erhaltenen Resultate uns genötigt, anzunehmen, dass ein Teil der Alginsäure in irgendeiner anderen Form als Calcium- und Magnessiumsalz in der Zellhaut vorliegt.

Es ist bekannt, dass die Pektinsäure der höheren Pflanzen ausser in Verbindung mit Calcium und Magnesium auch zum Teil in Form des Methylesters vorliegt. Im Hinblick hierauf erscheint die Annahme auch nicht unwahrscheinlich, dass die Alginsäure in der Zellhaut teilweise mit Methanol esterifiziert ist und die Esterbindung bei der Extraktion mit Alkali aufgesprengt wird. Deshalb habe ich versucht, diese Frage, mit *Eisenia bicyclis* als Versuchsobjekt, klarzustellen.

200 g der frischen, oberflächlich mit Wasser abgespülten Alge wurden in kleinen Stückchen geschnitten und in Mörser zerrieben. Dazu setzte man 100 ccm 10-proz. Natronlauge zu, erwärmte unter Rückfluss 20-minutenlang auf dem Wasserbad und liess übernacht stehen. Danach wurde das Produkt mit Schwefelsäure angesäuert und der Wasserdampf-destillation unterworfen. Das erhaltene Destillat, das etwa 380 ccm betrug, wurde durch weiteres 3-maliges Umdestillieren zu 50 ccm konzentriert und gewöhnlicherweise mit Schwefelsäure und Permanganat oxydiert. Nachdem der Überschuss des Permanganats mit Oxalsäure zersetzt worden war, wurde das Produkt abermals destilliert. An 20 ccm des Destillats wurde das Vorhandensein des Formaldehyds mit Hilfe der SCHRYVERschen Reaktion und der Hexamethylentetraminprobe geprüft, wobei die beiden Reaktionen ganz negativ ausfielen. Daraus geht es hervor, dass die Existenz der Methylesterverbindung in dieser Alge zu verneinen ist.

Mikrochemische Versuche

Trotzdem der Calciumgehalt der meisten Braunalgen nicht genügend so gross ist, um die gesamte Alginsäure zu binden, so spielt jedoch das Calcium, wie im folgenden gezeigt wird, für die Festigkeit der Zellhaut eine recht hervorragende Rolle. Früher hat H. KYLIN[1] nachgewiesen, dass das Calcium in der Mittellamelle der Zellmembran in Verbindung mit der Algin- und der Fucinsäure vorkommt. Dabei liess er der mikroskopischen Schnitte eine Lösung von Ammonoxalat einwirken, wodurch das Auftreten reichlicher Calciumoxalatkrystalle in der Mittellamelle beobachtet wurde.

Dieses Verfahren habe ich an verschiedenen Braunalgen geprüft und die KYLINsche Angabe bestätigt. Dabei wurde aber auch bemerkt, dass die Interzellularsubstanz durch solche Behandlung sehr stark aufquillt und allmählich in Lösung geht, sodass die Gewebestruktur in hohem Masse deformiert wird. Offenbar wird dies dadurch hervorgerufen, dass das unlösliche Calciumalginat durch das Ammonoxalat in das lösliche alginsaure Ammonium übergeführt wird.

Diese Erscheinung kann man noch deutlicher beobachten, wenn man das Calcium vorher beseitigt. Dazu wird die Schnitte zuerst in 1-proz. Salzsäure kurz (etwa 5 Minuten) getränkt, dann mit Wasser gewaschen und auf den Objektträger gebracht. Tropft man darauf 1-proz. Ammoniaklösung zu, so quillt die Mittellamelle augenblicklich auf und wird die Gewebestruktur fast sorfort zerstört. Zur Kontrolle wird die Schnitte ohne Vorbehandlung mit Salzsäure in 1-proz. Ammoniak getränkt.

---

(1) Z. physiol. Chem., **94**, 335 (1915).

Nach 2.5-stündigem Stehen bei Zimmertemperatur ist gar keine Veränderung der Zellhautstruktur bemerkbar und erst nach 25 Stunden wird die Zellwand etwas weicher. Nach 49 Stunden vermindert sich die Gewebefestigkeit so stark, dass sie durch leichtes Pressen unter Deckglas zerstört wird.

Zum mikrochemischen Nachweis des Calciums in der Zellwand ist das einfache Ammonoxalat nicht geeignet. Dazu erweist sich eine verdünnte Lösung (etwa 1%) des gepufferten Ammonoxalats (Oxalsäure-Ammonoxalat-Gemisch) von pH 3–3.5 oder einfach 0.5-proz. Oxalsäurelösung als empfehlenswert. Mit Hilfe dieser Reagenzien konnte ich die Existenz des Calciums in der Mittellamelle sicherstellen, ohne dass die Membranstruktur beschädigt wird (Fig. 2). Wenn man die Schnitte vorher mit Salzsäure behandelt, so bleibt das Auftreten der Kalkoxalatkrystalle vollkommen aus.

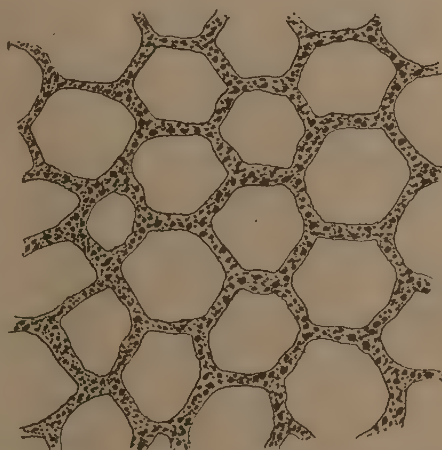


Fig. 2. Calciumoxalatkrystalle in der Zellmembran von *Eisenia bicyclis*. Querschnitt des Stengels, mit 0.5-proz. Oxalsäure behandelt. (×180)

Ebenso wie Calcium lässt sich auch Magnesium mikrochemisch leicht nachweisen. Dabei verfuhr ich wie folgt. Die Gewebeschnitte wird zuerst in 15-proz. Ammoniaklösung kurz getränkt und auf den Objektträger gebracht. Setzt man dazu einige Tropfen einer verdünnten Lösung (etwa 0.2 mol) vom sekundären Natriumphosphat hinzu, so treten nach kurzem Stehen charakteristische Krystalle von Magnesiumammoniumphosphat auf. Damit habe ich bei den folgenden Arten das Vorkommen des Magnesiums festgestellt: *Padina arborecens, Eisenia bicyclis, Undaria pinnatifida, Hijikia fusiforme.* Jedoch ist dabei die Lokalisation des Magnesiums deshalb mehr oder weniger schwer zu erkennen, weil das Gewebe stark aufquillt und deformiert wird. Dies beruht allem Anschein nach darauf, dass das Natriumphosphat das alginsaure Calcium unter Bildung von Calciumphosphat entkalkt, wodurch die Alginsäure in lösliches Alkalisalz übergeht. Ob das Magnesium auch in Verbindung mit Alginsäure vorkommt, bleibt daher noch festzustellen.

Ebenfalls verschwindet die Magnesiumreaktion vollkommen, falls die Schnitte mit verdünnter Salzsäure vorbehandelt wird.

Durch die oben geschilderten Versuche konnte aber die Frage nach dem Zustand der Alginsäure in der Zellmembran der Braunalgen noch nicht restlos aufgeklärt werden. Allein steht die Existenz des alginsauren Calciums fest, jedoch macht dies nur einen, mehr oder weniger kleinen Bruchteil der anwesenden Alginsäure aus.

Obzwar das Vorhandensein der wasserlöslichen Salze der Alginsäure, wie Alkali- oder Mg-salz, in der festen Interzellularsubstanz bisher verneint worden ist, so erscheint mir jedoch die Existenz der löslichen Salze nicht immer unmöglich, wenn man das Lebensmilieu der Braunalgen in Betracht zieht. Es ist von vornherein daran zu denken, dass die Art und die Konzentration der in Meerwasser befindlichen Ionen den Kolloidzustand der Alginsäure stark beeinflussen. So könnten die sonst löslichen Salze der Alginsäure auch die feste Mittellamelle ausbilden, wenn sie sich zusammen mit dem unlöslichen Calciumalginat in Meerwasser befinden. Allerdings erweist sich die Zellmembran der Braunalgen als weitgehend beständiger in Meer- als in Süsswasser, wie aus dem folgenden Versuch klar hervorgeht.

Aus dem lufttrockenen Thallus von *Laminaria japonica* und *Eisenia bicyclis* wurden die Schnitten (Querschnitt) hergestellt, von denen die eine in Meerwasser und die andere in destilliertem Wasser getränkt wurden. Nach dem Stehen bei Zimmertemperatur (20–22°) während der unten angegebenen Zeiten wurde der Quellungsgrad, gmessen an der Breite der Schnitte, verglichen, woraus sich folgende Resultate ergaben.

TABELLE IX

Quellungsgrad der Thallusschnitte in Meer- und Süsswasser

Milieu	Breite des Thallusquerschnitts	
	Laminaria japonica nach 10 Min.	*Eisenia bicyclis* nach 90 Min.
Dest. Wasser	2.34	0.74
Meerwasser	0.83	0.35

Hierbei wurde auch bei der Schnitte von *Laminaria japonica*, die in destilliertem Wasser getaucht worden war, beobachtet, dass die Interzellularsubstanz derjenigen Gewebe, die sowohl unter den Epidermalschichten als auch in dem Markteil liegen, im Laufe von 90 Minuten sogar teilweise gelöst wird, sodass die Schnitte beim leichten Pressen

unter Deckglas in vier Teilen, d.i. zwei Epidermalteilen und zwei Rindenteilen, getrennt wird.

Jedenfalls scheint die kolloidchemische Forschung der Membranstoffe zur Aufklärung der Frage, in welchem Zustand die Alginsäure in der Zellmembran vorliegt, einen wichtigen Aufschluss zu geben.

Zum mikrochemischen Nachweis der Alginsäure in der Zellmembran leisten wohl die meisten Pektinfarbstoffe, wie Rutheniumrot, Methylenblau u. a., gute Dienste. Ausserdem kann man auch durch Ablagerung farbiger Metallsalze befriedigende Resultate erzielen. Als Beispiel möchte ich die Anwendung des Ferrocyaneisens (Berlinerblau) erwähnen. Die Gewebeschnitte wird nach Vorbehandlung mit 1-proz. Salzsäure in 1-proz. Eisenchloridlösung kurz getränkt, wodurch die Alginsäure in Eisensalz übergeführt wird. Nach Auswaschen mit Wasser wird darauf 1-proz. Lösung von Kaliumferrocyanid getropft, wobei nur die Mittellamelle schön blau gefärbt wird. Mit Hilfe dieses Verfahrens konnte ich auch die Angabe der früheren Forscher durchaus bestätigen, dass die Alginsäure in der Mittellamelle der Zellmembran vorkommt.

Verhalten des Calciumalginats gegenüber verschiedenen Lösungsmitteln

Es ist schon längst bekannt, dass die Alginsäure aus den Braunalgen mittels Natriumcarbonatlösung allein, ohne Vorbehandlung mit Salzsäure, vollständig extrahiert werden kann, was von G. M. Bird und P. Haas als Grund für die Behauptung betrachtet wurde, dass die Alginsäure zum grossen Teil nicht in Form des unlöslichen Calciumsalzes vorliegt. Daher habe ich das reine Calciumsalz der Alginsäure hergestellt und das Löslichkeitsverhalten desselben gegenüber verschiedenen Lösungsmitteln geprüft.

1 Teil der reinen Alginsäure aus *Undaria pinnatifida*, deren Äquivalent vorher ermittelt war, wurde in 30 Teilen destillierten Wassers suspendiert und mit der berechneten Menge 0.2*n*-Kalilauge in Lösung gebracht. Dazu wurde eine berechnete Menge 0.2 m-Calciumchloridlösung unter heftigem Umschwenken zugetropft, die gallertartig erstarrte Masse mit einem Glasstab verrieben und übernacht stehen gelassen. Das Produkt wurde dann zum Entwässern und zur Entfernung des Kaliumchlorids zuerst mit 80-proz. und dann mit 96-proz. Äthanol je 3-mal behandelt und getrocknet. Die so erhaltene Substanz war Cl-frei.

Ca-Bestimmung:

$C_6H_7O_6 \cdot \frac{1}{2} Ca$ Ber. 10.25 %,
Gef. 9.7 %.

Zum Prüfen des Löslichkeitsverhaltens werden je 0.5 g der Substanz mit 15 ccm des Lösungsmittels geschüttelt und übernacht bei Zimmer-

temperatur stehen gelassen. Darnach wird das Gemisch filtriert und zu 5 ccm jedes Filtrats 1 ccm 5-proz. Salzsäure zugesetzt. Falls die Alginsäure in dem Filtrat gelöst enthalten ist, so tritt eine Fällung auf. Die Ergebnisse werden in der folgenden Tabelle gezeigt.

TABELLE X Löslichkeitsverhalten des Calciumalginats

Lösungsmittel	Fällung der Alginsäure in Filtrat	Bemerkung
1% Na_2CO_3	+++++	Ca-alginat grossenteils gelöst
0.5% Na_2CO_3	+++++	Ca-alginat grossenteils gelöst
0.5% NH_3	+	fast keine Auflösung
0.4% NaOH	++	fast keine Auflösung
Dest. Wasser	+	fast keine Auflösung

Wie daraus ersichtlich, stellt die Sodalösung ein geeignetes Lösungsmittel für Calciumalginat dar, was dafür verantwortlich ist, dass sich die Alginsäure unmittelbar mit Sodalösung vollständig extrahieren lässt.

Nebenbei möchte ich noch bemerken, dass das Calciumalginat mit einem sehr hohen Calciumgehalt (etwa 21%) durch Fällen mit einem Überschuss von Calciumchlorid und darauffolgende Dialyse erhalten wurde. Da es völlig frei von Cl ist, ist die Beimengung des Fällungsmittels, des Calciumchlorids, auszuschliessen. Darin könnte das Calcium auch an den Alkoholgruppen der Alginsäure gebunden sein. Bezüglich des Verhaltens gegenüber den oben angewandten Lösungsmitteln konnte kein nennenswerter Unterschied beobachtet werden.

e) Verhalten der Alginsäure gegenüber den Enzymen

Ebenso wie die meisten anderen Gerüstpolysaccharide, ist auch die Alginsäure enzymatisch schwerer angreifbar als die Reservepolysaccharide.

Im Jahre 1930 hat T. OHTSUKI[1] beobachtet, dass das Darmextrakt von *Haliotis gigantea* Alginsäure spaltet. Etwas später wurde von K. OSHIMA[2] berichtet, dass das Alginsäure spaltende Enzym in den Eingeweiden einiger algenfressender Tiere vorkommt. Diesem Enzym schlug er den Namen „Alginase" vor und stellte auf viskosimetrischem Wege das pH-Optimum als 7.2 fest. Die Alginase aus dem Hepatopankreas von

(1) Zool. Mag. Tokyo, **42**, 412 (1930).
(2) Bull. Agr. Chem. Soc. Japan, **7**, 332 (1931).

Aplysia punctata wurde von S. ENDO[1] erforscht, wobei auch die pH-Abhängigkeit und der Einfluss verschiedener Salze reduktometrisch ermittelt wurden. S. A. WAKSMAN und M. C. ALLEN[2] teilten mit, dass die Alginase auch bei einigen Bakterien vorkommt. Dabei wurde gezeigt, dass die enzymatische Spaltung der Alginsäure durch Bakterienenzyme nicht zu der monomeren *d*-Mannuronsäure geführt wird.

In der vorliegenden Arbeit habe ich die in dem Hepatopankreas von *Haliotis gigantea* befindliche Alginase näher erforscht.

Enzympräparate:

Frische Drüse wurde sorgfältig von den anderen Geweben befreit, mit der Fleischhackmaschiene zerkleinert und der erhaltene Brei mittels Aceton-Äther-Verfahrens ins Trockenpulver übergeführt. In diesem Zustand ist das Ferment längere Zeit haltbar. Daraus wurde das Enzym mit 0.02*n*-Ammoniak ausgezogen, mit verdünnter Essigsäure zu pH 5 angesäuert und der entstandene Niederschlag beseitigt. Die nahezu klare, jedoch etwas braun gefärbte Enzymlösung wurde mit verdünntem Ammoniak zu pH 7 gebracht und im Tierblasen 2-tagelang gegen Leitungswasser dialysiert.

Substrat:

Reine Alginsäure aus *Undaria pinnatifida* von Äquivalentgewicht 180.0 und von der spezifischen Drehung $[\alpha]_D^{18} = -133°$.

Obschon dieses Enzym die Alginsäure zwar spaltet, so ist jedoch die verzuckernde Wirkung viel schwächer als die verflüssigende, wie aus der folgenden Tabelle ersichtlich. Parallel mit der Herabsetzung der Viskosität der Alginsäurelösung nimmt auch die Gerinnbarkeit mit Mineralsäure oder mit dem Calciumsalz ab.

Ansatz:

0.4772 g Alginsäure (K-Salz) in 50.0 ccm Wasser,
Enzymlösung 50.0 ccm,
pH 6.9, Versuchstemperatur 25°.

Die Viskosität der Alginsäurelösung wurde mit Hilfe des OSTWALDschen Viskosimeters und das Reduktionsvermögen nach der Mikromethode von SHAFFER und HARTMANN an 1.0 ccm Ansatzflüssigkeit bestimmt.

---

(1) Zool. Mag. Tokyo, **46**, 351 (1934).
(2) J. Am. Chem. Soc., **56**, 2701 (1934).

TABELLE XI Verlauf der enzymatischen Spaltung der Alginsäure

Versuchsdauer Min.	Viskosität Ausflusszeit Sek.	Gerinnung mit		Reduktionsvermögen n/200-Thiosulfat ccm
		HCl	Ca-Acetat	
0	50.05	+++++	+++++	....
10	39.1	+++	+++	....
20	30.0	++	++	....
25	25.0	++	++	....
30	22.5	+	+	....
50	17.8	—	—	±0
70	13.3	—	—	0.10
90	13.2	—	—	0.21
120	14.1	—	—	0.12
150	13.1	—	—	0.21
170	14.0	—	—	0.16
1320	....	—	—	2.00
10080	....	—	—	2.17

* Die Ausflusszeit des destillierten Wassers beträgt 12.8 Sek.

Betreffs der Spaltungsprodukte der Alginsäure, die durch Einwirkung tierischen Ferments erzeugt werden, ist bis jetzt nichts näheres bekannt. Diesbezüglicher Versuch wurde folgendermassen angestellt.

Ansatz:

19.10 g Alginsäure (K-Salz) in 500 ccm Wasser,
Enzymlösung (konzentriert) 250 ccm,
Toluol 10 ccm.
pH 7, Versuchstemperatur 38°.

Der zeitliche Verlauf der enzymatischen Hydrolyse wird in der folgenden Tabelle veranschaulicht.

TABELLE XII

Versuchsdauer Tage	Probe ccm	n/200-Thiosulfat ccm	Gerinnung mit HCl	Uronsäure* mg in 1 ccm Probe	Spaltung %
1	1/3	4.57	—	3.14	12.3
3	1/5	3.71	—	4.67	18.4
10	1/5	4.71	—	5.46	21.5
17	1/5	5.12	—	5.69	22.4
23	1/5	5.23	—	5.79	22.8
41	1/3	9.36	—	5.49	21.6
41	1/5	5.26	—	5.81	22.9

* Berechnet aus der Tabelle für Glucuronsäure(1).

(1) T. MIWA in Acta Phytochim., 8, 231 (1935).

Daraus ist ersichtlich, dass die enzymatische Hydrolyse hierbei bei 21 bis 22-proz. Spaltung zum Stillstand kam.

Zum Erforschen der Spaltungsprodukte wurde das Reaktionsgemisch auf etwa 50 ccm eingeengt, mit 3.5 ccm konzentrierter Schwefelsäure versetzt und unter heftigem Umrühren in 500 ccm 96–proz. Äthanol hineingegossen. Nach kurzem Stehen wurde die Lösung durch eine dünne Schicht von Tierkohle filtriert. Man engte das Filtrat etwa bei 35° ein und nahm den resultierenden Sirup in 96-proz. Äthanol auf. Die von den unlöslichen Substanzen abfiltrierte Lösung wurde eingedampft und der Rückstand in Wasser gelöst. Die Lösung wurde dann mit Barytwasser gegen Lackmus neutralisiert, das von Bariumsulfat befreite Filtrat eingeengt und mit Äthanol gefällt. Das so gewonnene Bariumsalz wurde weiter noch einmal durch Umfällen aus der wässrigen Lösung mit Äthanol gereinigt. Daran wurde die Jodzahl nach M. BERGMANN[1] bestimmt.

0.1342 g Substanz verbrauchte 6.84 ccm 0.1*n*-Jod.

J.Z.	$C_6H_9O_7 \cdot \frac{1}{2}Ba$	Ber.	75.6,	Mol-gew.	261.7.
		Gef.	51.0,	Mol-gew.	392.1.

Also liegt das gefundene Molekulargewicht der niedermolekularen Fraktion zwischen denjenigen der monomeren und der dimeren Uronsäure, was darauf hinweist, dass dieses Spaltprodukt noch nicht einheitlich ist.

Trotzdem die monomere Uronsäure hierbei nicht isoliert werden konnte, scheint es mir aber auch aus der gefundenen Jodzahl nicht unberechtigt, anzunehmen, dass die enzymatische Spaltung der Alginsäure zu der monomeren Stufe geführt worden sei.

Ferner habe ich das Verhalten der Alginsäure gegenüber Takadiastase, Malz- und Pankreasenzym geprüft, woraus sich ergab, dass alle diese Fermentpräparate völlig unwirksam gegen Alginsäure sind. Daraus ist ersichtlich, dass die Verbreitung der Alginase sehr beschränkt ist.

4. Membranschleim

a) Allgemeines

Der Schleimgang verschiedener Braunalgen enthält wasserlösliche, sehr visköse Substanzen, die analog den Schleimstoffen der höheren Pflanzen, wie Gummi arabicum, Kirschgummi, Gummi tragant u.a., als Umwandlungsprodukt der Zellmembran anzusehen sind.

---

(1) Ber. Dtsch. Chem. Ges., **63**, 316, 2304 (1930).

H. KYLIN[1] nannte denjenigen Schleimstoff der Braunalgen Fukoidin, der aus der wässrigen Lösung nicht mit dem neutralen Bleiacetat sondern erst mit dem basischen gefällt wird. Nach dem genannten Autor stellt diese Substanz das Calciumsalz einer Säure, Fukoidinsäure, dar, welche die positiven Reaktionen der Pentose und der Methylpentose gibt. Bei der Hydrolyse wurde daraus die Fukose als Phenylhydrazon nachgewiesen. Dabei blieb jedoch die Frage unbeantwortet, worauf die Säurenatur dieser Substanz beruht.

Von D. R. HOAGLAND und L. L. LIEB[2] wurde der Schleimstoff von *Macrocystis pyrifera* untersucht. Sie zeigten, dass dieser Schleim das Kohlenhydrat und die organisch gebundene Schwefelsäure als Calciumsalz enthält. Die Existenz der organischen Schwefelsäureverbindung haben die Autoren daraus geschlossen, dass das Sulfat des Schleims nicht direkt sondern erst nach Erhitzen mit Salzsäure mit Bariumchlorid reagiert. Bei der Hydrolyse wurde daraus auch die Fukose nachgewiesen.

Neuerdings haben W. L. NELSON und L. H. CRETCHER[3] den Schleimstoff derselben Alge noch eingehender untersucht. Aus der lufttrockenen Alge wurde die Substanz durch Ausziehen mit 2-proz. Salzsäure und Fällen mit Alkohol gewonnen. Sie stellte eine ziemlich starke Säure dar, die leicht mit Alkali titrierbar ist. Auf dem Grunde, dass die beiden Komponenten, Methylpentose und Schwefelsäure, sich nahezu in äquimolekularem Verhältnis vorfinden, haben die Autoren geschlossen, dass dieser Schleim im wesentlichen ein Polymeres des sauren Monoesters der Fukose darstellt. Bei der Hydrolyse wurde die Fukose krystallisiert erhalten. Die in geringer Menge vorhandene Uronsäure dürfte nach diesen Autoren nicht ein Baustein sondern ein Beimengung sein.

Der Schleimstoff von *Laminaria* wurde von G. M. BIRD und P. HAAS[4] untersucht. Er wurde aus dem wässrigen Auszug der Alge durch Fällen mit Alkohol und darauffolgende Dialyse gewonnen. Beim Vergleich der Sulfatmenge, die sich einerseits durch Hydrolyse mit Salzsäure und andererseits durch Veraschung bestimmen lässt, wurde gefunden, dass das Aschensulfat, welches grossenteils aus Calciumsulfat besteht, nur etwa ½ der durch Hydrolyse erhaltenen Menge beträgt, was als Beweis dafür betrachtet wurde, dass die Schwefelsäure in Form sauren Esters vorliegt. Als Kohlenhydratkomponenten haben sie daraus die Fukose und eine Uronsäure gefunden, von denen die erstere als Phenylosazon identifiziert wurde, während die chemische Natur der letzteren nicht festgestellt werden konnte.

(1) Z. physiol. Chem., **83**, 171 (1913); **94**, 335 (1915).
(2) J. Biol. Chem., **23**, 287 (1915).
(3) Ebenda, **94**, 147 (1931)
(4) Biochem. J., **25**, 403 (1931).

Kürzlich wurde der Schleim von *Laminaria digitata* von G. LUNDE, H. HEEN und E. OY[1] erforscht. Im Gegensatz zu den früheren Forschern haben diese Autoren nur die wasserklaren Schleimtropfen zum Untersuchungsmaterial herangezogen, die aus der Schnittfläche oder der Risse von Thallus ausgeschieden werden. Dabei wurde das Verhältnis des Aschensulfats zu der durch Hydrolyse hervorgegangenen Schwefelsäure als 1:2 festgestellt. Der Gehalt an Methylpentose, deren Identifizierung noch nicht mit Erfolg durchgeführt wurde, beträgt 33.5–36% der Trockensubstanz. Auf Grund dieser Beobachtungen haben diese Autoren eine Vermutung geäussert, dass diesem Kohlenhydratsulfat folgende Formel zugeteilt werde:



$$(R.R_1\text{-}OSO_2\text{-}OMe)_n$$

R und R_1 ...... teils Fukose, teils anderer Kohlenhydratkomplex,
Me .... Metall.

Aus den dargelegten Angaben kann man mit grosser Wahrscheinlichkeit sagen, dass die Schleimstoffe der Braunalgen den Kohlenhydratschwefelsäureester als wichtige Komponente enthält.

Es ist schon längst bekannt, dass die meisten Schleim- bzw. Gummistoffe der höheren Pflanzen Substanzen von Säurenatur sind. Neuere Forschungen darüber haben ergeben, dass die Uronsäuren, entweder Glucuron- oder Galakturonsäure, dafür verantwortlich zu machen sind.

Im Hinblick darauf erscheint es uns interessant, festzustellen, ob an Aufbau des Membranschleims der Braunalgen, dessen Säurenatur wenigstens zum Teil von dem sauren Schwefelsäureester herzurühren scheint, auch die Uronsäure sich beteiligt oder nicht. Weiterhin ist es auch festzustellen, ob der Membranschleim der anderen Braunalgen auch das Polysaccharidsulfat als Komponente enthält.

Zu den vorliegenden Versuchen wurden *Fucus evanescens, Eisenia bicyclis* und *Laminaria japonica* als Versuchsobjekt herangezogen.

b) Membranschleim von *Fucus evanescens*

Darstellung

1 kg der lufttrockenen Algen wurde mit Wasser oberflächlich abgespült und unter Zusatz von etwa 5 l. Wasser während 3.5 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Die weich gewordenen Algen wurden nun mit Messer möglichst fein zerschnitten, mit 25 l. Wasser und etwas Toluol versetzt und unter gelegentlichem Umschwenken bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Nach 4 Tagen wurde die Lösung durch Watte filtriert, das Filtrat unter vermindertem Druck zu etwa 1 l. eingeengt

(1) Z. physiol. Chem., **247**, 189 (1937).

und mit Salzsäure zu 1-proz. versetzt, wodurch die in Lösung gegangene Alginsäure pulverig gefällt wurde. Nach dem Stehen übernacht wurde die Lösung filtriert, das saure Filtrat mit Tierkohle entfärbt und nach dem Neutralisieren mit Ammoniak auf etwa 300 ccm eingeengt. Nachdem man diese Lösung im Tierblasen 4-tagelang gegen destilliertes Wasser dialysiert hatte, wurde sie zu einem halben Volumen eingeengt und der Schleimstoff mit Alkohol gefällt. Der Niederschlag wurde filtriert und durch Behandlung mit Aceton und Äther getrocknet. Das Produkt ist ein braunstichiges, grauweisses Pulver, löslich in Wasser, jedoch nicht ohne sehr schwache Trübung.

Qualitative Reaktionen

Reduktionsvermögen	—
SELIWANOFFsche Reaktion nach Ketose	—
PINOFFsche Reaktion nach Ketose	—
Phloroglucinreaktion nach Pentose	?
BIALsche Orcinreaktion nach Pentose	?
ROSENTHALERsche Reaktion nach Methylpentose	++
Naphthoresorcinreaktion nach Uronsäure	?
Freies SO_4 (direkt mit $BaCl_2$ fällbar)	—
Freies SO_4 (nach Erhitzen mit HCl)	++

Quantitative Bestimmung

Zuvor wurde die Substanz bei 100° im Vakuum über Phosphorpentoxyd zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Methylpentosan:

0.1877 g Substanz 0.0442 g Methylfurfurolphloroglucid,
d.h. nach der MEYERschen Tabelle 0.0839 g (44.7 %) Fukose.

Uronsäure:

0.3880 g Substanz 0.0016 g CO_2,
d.h. 0.0064 g (1.65%) Uronsäureanhydrid.

Gesamtzucker und Schwefelsäure:

0.630 g Substanz wurden in 100 ccm 5-proz. Salzsäure gelöst und auf dem siedenden Wasserbad solange erhitzt, bis das Reduktionsvermögen nicht mehr zunahm (etwa 6 Stunden). Das Hydrolysat, aus dem 2 ccm zur Bestimmung des Reduktionsvermögens herausgenommen waren, wurde von dem geringen bräunlichen Niederschlag abfiltriert und auf 200 ccm aufgefüllt. An dem Aliquot wurden das Sulfat und der Gesamtzucker (nach BERTRAND) bestimmt.

Gesamtzucker 0.292 g (46.4 %) als Fukose.
SO_4 0.1795 g (28.5 %).

Asche:

0.7651 g Substanz	0.1815 g Asche.

Die Gesamtmenge der gebildeten Asche wurde zur Bestimmung von Sulfat und Calcium in 50 ccm verdünnter Salzsäure gelöst.

25.0 ccm	0.0482 g SO_4,
	bezogen auf Trockensubstanz 12.6%,
	bezogen auf Gesamtache 53.1%,
25.0 ccm	0.0091 g Ca,
	bezogen auf Trockensubstanz 2.36%,
	bezogen auf Gesamtasche 10.0%.

Isolierung der Fukose

7.3 g der Substanz wurden in 200 ccm 3-proz. Schwefelsäure gelöst und 8-stundenlang auf dem siedenden Wasserbade hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde mit Bariumcarbonat neutralisiert und nach dem Entfärben mit Tierkohle unter vermindertem Druck fast zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde mit heissem 96-proz. Äthanol ausgezogen und das alkoholische Filtrat wiederum zum Sirup eingedampft, der dann in 5 ccm Wasser gelöst wurde. Dazu setzte man 3 ccm Phenylhydrazin und 2.5 ccm Eisessig zu und nach kurzem Erwärmen liess im Eisschrank abkühlen, wobei die Flüssigkeit zu einer orangegelben Krystallmasse erstarrte. Nach dem Stehen übernacht wurden die Hydrazonkrystalle filtriert, scharf abgesaugt, mit Wasser und mit eisgekühltem Äthanol nachgewaschen. Nach 2-maligem Umkrystallisieren aus Äthanol wurden fast reine, noch schwach gelbliche Krystalle des Fukose-phenylhydrazons vom Schmelzpunkt 167–8° gewonnen.

Das so erhaltene Hydrazon wurde nach dem üblichen Benzaldehydverfahren in freien Zucker übergeführt. Nach Umsetzen mit Benzaldehyd in verdünntem Alkohol wurde das Benzaldehydphenylhydrazon abfiltriert und das Filtrat mehrmals mit Äther geschüttelt. Die wässrige Lösung wurde im Vakuum zum dicken Sirup eingedampft, der in 96-proz. Äthanol gelöst wurde. Das alkoholische Filtrat dampfte man abermals zum Sirup ein und bewahrte ihn unter Zusatz von 2 ccm absolutem Äthanol und einigen Tropfen von Äther im Eisschrank auf. Im Laufe von 3 Tagen schied sich eine reichliche Menge von Fukosekrystallen aus, die auf dem Filter mit Alkohol und Äther gewaschen und im Exsikkator über Schwefelsäure getrocknet wurden.

Schmelzpunkt 143°.

$$[\alpha]_D^{23} = \frac{-1.17° \times 100}{1.573 \times 1} = -74.2° \quad \text{(im Wasser, nach 18 Stunden).}$$

Mithin stellt der erhaltene Zucker reine *l*-Fukose dar.

Daraus wurden auch Fukose-α-methylphenylhydrazon vom Schmp. 179° und Fukose-p-bromphenylhydrazon vom Schmp. 177° hergestellt.

Aus diesen Resultaten ist zu ersehen dass der Schleimstoff von *Fucus evanescens* im wesentlichen ein Polysaccharidschwefelsäureester ist.

Auf dem Grunde, dass die Menge des durch Hydrolyse erzeugten Gesamtzuckers mit der der nach MAYER und TOLLENS ermittelten Fukose nahezu übereinstimmt, kann man mit Sicherheit schliessen, dass nur die Fukose allein den gesamten Kohlenhydratanteil dieser Substanz bildet.

Das molekulare Verhältnis der Fukose zu der Schwefelsäure lässt sich aus dem Prozentgehalt der Fukose und der Schwefelsäure berechnen, woraus sich das Verhältnis von etwa 1:1 ergab.

Fukosegehalt 44.7 %, 46.4 %
Mol.-Gew. $C_6H_{12}O_5 = 164.$

$$\frac{44.7}{164} = 0.272, \qquad \frac{46.4}{164} = 0.277.$$

SO_4-Gehalt 28.5 %.
Mol.-Gew. 96.

$$\frac{28.5}{96} = 0.297.$$

$$\text{Mithin,}\quad \frac{\text{Fukose}}{SO_4} = \frac{0.272}{0.297} = \frac{1}{1.09}, \quad \frac{0.277}{0.297} = \frac{1}{1.07}.$$

Auch lässt uns die Tatsache, dass das bei der Hydrolyse ermittelte Sulfat etwa doppelt so gross ist wie das Aschensulfat, mit grosser Wahrscheinlichkeit vermuten, dass die Schwefelsäure als saurer Ester an Fukose gebunden sei.

Obschon eine geringe Menge von Uronsäure nachgewiesen wurde, so ist sie aber vielmehr als eine Verunreinigung anzusehen, da es möglich erscheint, dass die bei der Extraktion des Schleims mit in Lösung gegangene Alginsäure nicht vollständig entfernt worden war.

Daraus kann man mit Wahrscheinlichkeit schliessen dass der Schleimstoff von *Fucus evanescens* ein Polymer des sauren Fukosemonoschwefelsäureesters von der folgenden Formel darstellt.



$(C_6H_9O_3\text{-}O\text{-}SO_2O\text{-}M)_n \qquad M = \text{Metall.}$

c) Membranschleim von *Eisenia bicyclis*

Darstellung

Die frischen, unmittelbar vor Verarbeitung gesammelten Algen wurden mit Wasser gewaschen und mit Messer zerschnitten. Dazu

setzte man etwa 10-fache Menge 0.5-proz. Salzsäure zu und liess sie unter öfterem Umrühren bei Zimmertemperatur stehen. Nach 2 Tagen wurde der Auszug durch ein Tuch filtriert und das noch getrübte, dünnflüssige Filtrat in einem grossen Zylindergefäss gestellt. Beim Stehen setzten sich allmählich winzige Gewebefragmente sowie auch andere suspendierte Verunreinigungen am Boden des Gefässes ab, wovon die fast klare Flüssigkeit durch Dekantieren abgetrennt wurde. Sie wurde durch Watte filtriert und das klare Filtrat, nachdem man es mit Sodalösung gegen pH 5–5.5 gebracht hatte, im Vakuum bei einer Temperatur von 40–45° eingeengt. Der so gewonnene braune Sirup wurde unter heftigem Umrühren in 5-fache Menge von Äthanol hineingegossen, wobei eine sehr zähige, tief braune Masse erzeugt wurde. Man dekantierte die alkoholische Lösung ab, gab von neuem einen starken Alkohol zu und bewahrte sie im Eisschrank auf, wobei die sehr visköse Masse allmählich zu einen festen Kuchen erstarrte. Danach wurde das Produkt von der Mutterlauge abgetrennt, im Mörser unter Zusatz von wenig Alkohol fein zerrieben und filtriert. Dabei ging der Hauptteil der farbigen Substanz in Alkohol über, wodurch die Schleimsubstanz in Form eines schwach braunen, sehr hygroskopischen Pulvers erhalten werden konnte.

Zur Reinigung wurde das Produkt in wenig Wasser gelöst und im Cellophanschlauch 3-tagelang gegen destilliertes Wasser dialysiert. Darnach wurde die Lösung mit Tierkohle behandelt und unter vermindertem Druck zum dünnen Sirup eingeengt, der dann mit Äthanol gefällt wurde. Der flockige Niederschlag wurde stark abgesaugt, mit Äthanol gewaschen und in wenig Wasser gelöst. Nun liess man die Lösung unter kräftigem Umrühren in 10-fache Menge 96-proz. Äthanol, zu dem die Salzsäure zu 1-proz. zugesetzt war, hineintropfen und übernacht im Eisschrank stehen. Das von Äthanol abgetrennte Produkt wurde weiter noch zweimal durch Umfällen mit salzsäurehaltigem Äthanol zur Cl-Freiheit gewaschen und nach Behandlung mit Aceton und Äther im Vakuumexsikkator über Chlorcalcium getrocknet.

Das Produkt stellt nun ein schwach bräunliches Pulver dar und ist nicht mehr hygroskopisch. Es ist spielend löslich in Wasser, wobei eine schwach opalisierende Flüssigkeit mit einer geringen Viskosität resultiert. Es ist sauer reagierend, indem das pH der 1-proz. Lösung 3.8 ist. Es wird durch das neutrale Bleiacetat nicht, wohl aber durch das basische gefällt.

Qualitative Reaktionen

Redutionsvermögen	—
SELIWANOFFsche Reaktion nach Ketose	—
PINOFFsche Reaktion nach Ketose	—

Phloroglucinreaktion nach Pentose	?
BIALsche Orcinreaktion nach Pentose	?
ROSENTHALERsche Reaktion nach Methylpentose	+
Naphthoresorcinreaktion nach Uronsäure	—
Freies SO_4 (direkt mit $BaCl_2$ fällbar)	—
Freies SO_4, nach Erhitzen mit HCl	++

Daraus ergibt sich, dass dieser Schleimstoff einen Polysaccharidschwefelsäureester darstellt, an dessen Aufbau sich die Methylpentose beteiligt.

Quantitative Bestimmung

Dazu wurde die Substanz bei 100° im Vakuum über Phosphorpentoxyd getrocknet.

Pentosan, Methylpentosan und Gesamtsulfat:

0.5207 g Substanz 0.0222 g Methylfurfurolphloroglucid,
i.e. nach der MAYERschen Tabelle 0.0536 g (10.3 %) Fukose.
0.0031 g Furfurolphlorogulcid.

Aus der sehr geringen Menge von Furfurolphloroglucid ist das Vorhandensein der Pentose zweifelhaft.

Mit dem Destillationsrückstand wurde das Sulfat bestimmt:

0.0335 g (6.63 %) SO_4.

Uronsäure:

0.4571 g Substanz 0.0040 g (0.88 %) Uronsäureanhydrid.

Hydrolyse

7.129 g der Substanz wurden mit 270 ccm 3-proz. Schwefelsäure versetzt und unter Rückfluss auf dem siedenden Wasserbad erhitzt. Von Zeit zu Zeit wurde daraus je 1.0 ccm Probe entnommen und der Verlauf der Hydrolyse mit der BERTRANDschen Methode verfolgt.

TABELLE XIII

Verlauf der Zuckerbildung aus dem Schleimstoff von *Eisenia bicyclis* bei der Hydrolyse

Dauer der Erhitzung Min.	0.1n-$KMnO_4$ ccm	Reduzierender Zucker % als Glucose
75	4.21	50.3
140	6.75	81.3
335	7.32	88.5
420	7.28	88.2

Das Hydrolysat wurde mit Barytwasser neutralisiert und das Filtrat nach dem Entfärben mit Tierkohle im Vakuum zum dünnen Sirup eingedampft. Er wurde dann in etwa 7-facher Menge 96-proz. Äthanol unter heftigem Umrühren zugetropft, wobei nur ein sehr geringer Niederschlag auftrat. Nach dem Stehen übernacht wurde das alkoholische Filtrat zum dicken Sirup eingedampft und der Rückstand in Wasser gelöst und auf 50 ccm aufgefüllt.

Bestimmung der Zuckerkonzentration der Lösung:

0.50 ccm, 15.83 ccm 0.1011 n-$KMnO_4$,
53.8 mg als Glucose.

Drehungsvermögen:

$$[\alpha]_D^{23} = \frac{+3.15 \times 100}{10.17 \times 1} = +29.3°.$$

Nachweis der Zuckerarten

5 ccm dieser Lösung wurden mit 0.8 ccm Phenylhydrazin und 1.2 ccm Eisessig in 15 ccm Wasser versetzt und bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Im Laufe der 160 Minuten wurden keine Hydrazonkrystalle erzeugt. Erst beim Erwärmen auf dem Wasserbade schied sich eine sehr beträchtliche Menge gelber Osazonkrystalle aus, die heiss filtriert, mit kaltem Aceton gewaschen und im Exsikkator getrocknet wurden. Das Produkt stellte lange Nadeln dar und schmolz bei 207–208°. Mischprobe mit dem aus der reinen Glucose hergestellten Phenylosazon ergab keine Depression des Schmelzpunkts.

Zieht man die Tatsache in Betracht, dass die beiden Ketosereaktionen negativ ausfielen und dass das Mannosephenylhydrazon nicht erzeugt wurde, so kann man mit grosser Wahrscheinlichkeit schliessen, dass das erhaltene Glucosazon von Glucose stammt.

Nach dem Ergebnis der Methylpentosanbestimmung soll der Schleimstoff etwa 10% von Methylpentose enthalten. Unter den beiden, in der Natur vorkommenden Methylpentosen ist *l*-Fukose, wie vorstehend erwähnt, mehrfach aus den Braunalgen nachgewiesen worden. Die andere, *l*-Rhamnose, die einmal nur als Paarling verschiedener Glykoside erkannt war, ist neuerdings auch als Bestandteil der Schleimstoffe und Hemicellulosen bekannt geworden, so z.B. bei Chollagummi(1), Schleimstoff von Flachssamen(2), Samen der weissen Senfölpflanze(3), sowie auch von *Lepidium sativum*(4). Wie es an anderer Stelle berichtet wird, habe

(1) L. Sands u. M. Sturgis in Am. J. Pharm., **97**, 589 (1925).
(2) E. Anderson u. J. A. Crowder in J. Am. Chem. Soc., **52**, 3711 (1930).
(3) K. Bailey u. F. W. Norris in Biochem. J., **26**, 1609 (1932).
(4) K. Bailey, Ebenda, **29**, 2477 (1935).

ich auch diesen Zucker als eine Komponente der Hemicellulose von einer Grünalge, *Enteromorpha* sp., nachgewiesen. Daher erscheint es uns wünschenswert, die chemische Natur der in *Eisenia*-Schleimstoff vorkommenden Methylpentose klarzulegen.

Zu diesem Zwecke liess ich zunächst verschiedene substituierte Phenylhydrazine auf die Zuckerlösung, die durch Hydrolyse des Schleims erhalten war, einwirken.

Zu 5 ccm der Zuckerlösung wurden 0.5 ccm α-Methylphenylhydrazin und Äthanol zugesetzt, auf dem Wasserbade schwach erwärmt und dann bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach 4 Tagen wurden keine Hydrazonkrystalle erzeugt.

Zu den anderen 5 ccm der Zuckerlösung setzt man 0.6 ccm α-Benzylphenylhydrazin in Äthanol zu und wie oben behandelt. Es wurde selbst nach 6-tägigem Stehen, kein Hydrazon gebildet.

5 ccm der Zuckerlösung wurden mit 0.2 g des zuvor umkrystallisierten *p*-Tolylhydrazins und 0.5 ccm Eisessig in 5 ccm Wasser versetzt, schwach erwärmt und bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach etwa 8 Stunden schieden sich feine, gelbe Nädelchen aus, die nach dem Stehen übernacht filtriert und aus 30-proz. Äthanol umkrystallisiert wurden. Sie waren hellgelbe Nadeln mit dem Schmelzpunkt von 192°. Aus dem Mutterlauge wurden beim Erwärmen auf dem Wasserbade dieselben Krystalle produziert. Der Schmelzpunkt dieses Produkts stimmt mit dem des Glucose-*p*-tolylosazons (193°) überein. Die Identität wurde durch Mischprobe (Mischschmelzpunkt 192°) sichergestellt.

Somit wurde das Vorhandensein der Glucose nochmals bestätigt, während der Nachweis der Methylpentose noch nicht erzielt wurde.

Da aber die Existenz der Methylpentose auf Grund der oben erwähnten Versuchsergebnisse nicht zu zweifeln ist, so habe ich im folgenden Versuch die Identifizierung dieses Zuckers nach Beseitigen der Glucose durchzuführen, weil die Gegenwart der anderen Zucker den Nachweis des gesuchten Zuckers meist verhindert.

Zu 25 ccm der obigen, durch Hydrolyse des Schleimstoffs erhaltenen Zuckerlösung wurden 2.5 g der frischen Bierhefe und 10 ccm Wasser zugesetzt und bei Zimmertemperatur im Dunkel gehalten. Nach 4 Tagen wurde die Flüssigkeit durch Zentrifugieren von Hefen getrennt und im Vakuum fast zur Trockene verdampft. Der Rückstand wurde mit heissem 96-proz. Äthanol ausgezogen und das alkoholische Filtrat wiederum zum Sirup eingedampft, der dann in 4 ccm Wasser gelöst wurde. Dazu setzte man 0.2 g *p*-Bromphenylhydrazin und 8 Tropfen 50-proz. Essigsäure zu, erwärmte schwach und liess bei Zimmertemperatur stehen. Nach einigen Minuten schieden sich Hydrazonkrystalle aus, die, nach 7.5-stündigem Stehen, filtriert, mit Wasser, abs. Alkohol und Äther

gewaschen und aus heissem Wasser umkrystallisiert wurden, wobei sich schwach gelbbräunliche, glänzende Nadeln vom Schmelzpunkt 176–177° ergaben. Mischschmelzpunkt mit dem aus Fukose dargestellten *p*-Bromphenylhydrazon zeigte keine Depression.

Aus dem Filtrat von Hydrazonkrystallen wurde der Überschuss des *p*-Bromphenylhydrazins in üblicher Weise mittels Benzaldehyds entfernt. Die resultierende Lösung (3 ccm) wurde mit 0.2 g *p*-Tolylhydrazin, das ein ziemlich empfindliches Reagens für Rhamnose ist, und 1 ccm 50-proz. Essigsäure versetzt und bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Selbst nach 7 Tagen wurde kein Hydrazon erzeugt.

Daraus geht es mit Sicherheit hervor, dass die Methylpentose, welche einen Bestandteil des *Eisenia*-Schleims darstellt, *l*-Fukose ist. Das Vorkommen der Rhamnose ist zu verneinen.

Aus alledem ist zu ersehen, dass der Schleimstoff von *Eisenia* demjenigen von *Fucus* nahesteht, insofern als die Fukose und die Schwefelsäure als Baustein enthalten sind. Der wesentliche Unterschied liegt darin, dass der *Eisenia*-Schleim daneben eine beträchtliche Menge von Glucose enthält, die dem *Fucus*-Schleim fehlt. Daher ist man nicht ohne weiteres imstande, anzunehmen, dass die Schwefelsäure an Fukose gebunden sei.

Berechnet man dagegen das molekulare Verhältnis, Fukose: Sulfat, aus dem Gehalt an Fukose und Schwefelsäure, so bekommt man das Verhältnis von etwa 1:1.

Fukosegehalt 10.3 %,

Mol.-Gew. $C_6H_{12}O_5 = 164$.

$$\frac{10.3}{164} = 0.0627.$$

SO_4-Gehalt 6.3 %,

Mol.-Gew. 96.

$$\frac{6.63}{96} = 0.0689.$$

Mithin; $$\frac{\text{Fukose}}{SO_4} = \frac{0.0627}{0.0689} = \frac{1}{1.1}.$$

Dies zusammen mit dem Befund, dass die Schleimstoffe von *Macrocystis* und *Fucus* als Polymeres des sauren Fukosemonoschwefelsäureesters zu betrachten sind, macht die Annahme naheliegend, dass auch bei dem *Eisenia*-Schleim die Schwefelsäure an Fukose in Form von saurem Monoester gebunden sei.

Es bleibt die Frage noch offen, ob die Kohlenhydratkomponente des *Eisenia*-Schleims nur aus Glucose und Fukose besteht oder nicht. Schon aus der hohen Ausbeute des Glucosazons und dem geringen Gehalt der Methylpentose, scheint die Glucose den Hauptteil des Zuckers im Hydrolysat auszumachen. Vorausgesetzt dass die anderen Zucker als Glucose (89.7%) und Fukose (10.3%) nicht vorhanden sind, so errechnet sich der Drehungswert des Hydrolysats als $[\alpha]_D=+37.6°$. Der gefundene Wert, +29.3°, ist im Vergleich damit etwas niedrig, was mit Wahrscheinlichkeit darauf hindeutet, dass im Hydrolysat noch eine geringe Menge der entweder niedrig rechtsdrehenden oder linksdrehenden Zucker enthalten ist.

In den verschiedenen Braunalgen findet sich das Laminarin, welches ein Reservepolysaccharid mit Glucose als alleiniger Baustein ist. Es ist in Wasser und in verdünntem Alkohol löslich und wird durch Bleiessig nicht, wohl aber durch Bleiessig und Ammoniak gefällt. Die frühere Angabe von R. W. BAUER(1), dass die Glucose bei der Hydrolyse des Schleimstoffs von *Laminaria* entsteht, wurde von H. KYLIN(2) so gedeutet, dass dieser Zucker nicht aus Membranschleim sondern aus Laminarin hervorgegangen war.

In Anbetracht dieses Befundes erscheint es mir auch nicht unmöglich, dass die bei der Hydrolyse des *Eisenia*-Schleims gebildete Glucose aus dem beigemengten Laminarin stammt. Da es schon andererseits bekannt ist, dass das Laminarin durch Malzextrakt zu dem reduzierenden Zucker gespalten wird, habe ich zur Entscheidung dieser Frage versucht, das Verhalten des Schleimstoffs gegenüber dem Malzenzym zu prüfen.

Ansatz:

1. 2-proz. Schleimstoff (neutralisiert mit Sodalösung gegen pH 6) 25 ccm,
   Dialysiertes Malzextrakt 10 ccm.
2. Wasser 25 ccm,
   Dialysiertes Malzextrakt 10 ccm.
3. 2-proz. Schleimstofflösung 25 ccm,
   Wasser 10 ccm.

TABELLE XIV
Einwirkung des Malzenzyms auf *Eisenia*-Schleim
Die Zahlen bedeuten ccm 0.10 *n*-Permanganatlösung für 5 ccm Probe

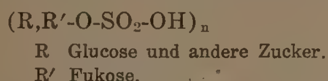
Nr.	Versuchsdauer (Tag)			
	2	4	7	20
1	0.20	0.31	0.32	0.34
2	0.17	0.25	0.27	0.28
3	0	0	0	0

Zum Prüfen der Enzymwirkung wurde das Reduktionsvermögen der Ansatzlösung mittels der BERTRANDschen Methode bestimmt.

Also wird der Schleimstoff durch Malzenzym nicht angegriffen, was vielleicht mit Recht auf das Fehlen des Laminarins

(1) Ber. Dtsch. Chem. Ges., **22**, 1 (1889).
(2) Z. physiol. Chem., **83**, 171 (1913).

im Schleim hindeutet. Daraus wird geschlossen, dass die Glucose einen integrierenden Bestandteil des *Eisenia*-Schleims darstellt. Mithin möchte ich diesem Stoff folgende Formel geben:



$$(R,R'\text{-}O\text{-}SO_2\text{-}OH)_n$$

R Glucose und andere Zucker.
R′ Fukose.

Weiterhin wurde das Verhalten dieses Schleimstoffs gegenüber verschiedenen anderen Fermenten untersucht, wobei besonders beachtet wurde, ob dabei neben der verzuckrnden Wirkung auch die sulfatatische in Erscheinung tritt.

Fermentpräparate:

1) Pankreasenzym, ein käufliches Präparat von „Protamylase", etwa 2-proz. Lösung, 3-tagelang dialysiert, und klar filtriert.

2) Takadiastase, etwa 4-proz. Lösung, 3-tagelang dialysiert.

3) *Haliotis*-Enzym, das Acetonpräparat des Hepatopankreas wurde mit 0.05 *n*-Ammoniak extrahiert, das Extrakt mit Essigsäure zu pH= 4.5 angesäuert, der gebildete Niederschlag abzentrifugiert und die klare Lösung nach Neutralisieren mit Ammoniak 2-tagelang dialysiert.

4) Enzyme aus *Bac. coli* und *Bac. fluorescens liquefaciens*, beide Bakterien wurden auf dem Fleischextrakt-Pepton-Agar gezüchtet und daraus Acetonpräparate dargestellt. Jedes Bakterienpulver wurde mit 0.05 *n*-Ammoniak ausgezogen, das Extrakt ganz in derselben Weise wie bei *Haliotis*-Enzym gereinigt.

Ansatz:

1.	2-proz. Schleimstoff	10 ccm,	Pankreasenzym	10 ccm.
2.	Wasser	10 ccm,	Pankreasenzym	10 ccm.
3.	2-proz. Schleimstoff	10 ccm,	Takadiastase	10 ccm.
4.	Wasser	10 ccm,	Takadiastase	10 ccm.
5.	2-proz. Schleimstoff	10 ccm,	*Haliotis*-Enzym	10 ccm.
6.	Wasser	10 ccm,	*Haliotis*-Enzym	10 ccm.
7.	2-proz. Schleimstoff	10 ccm,	Enzym aus *Bac. coli*	10 ccm.
8.	Wasser	10 ccm,	Enzym aus *Bac. coli*	10 ccm.
9.	2-proz. Schleimstoff	10 ccm,	Enzym aus *Bac. fluor.*	10 ccm.
10.	Wasser	10 ccm,	Enzym aus *Bac. flour.*	10 ccm.
11.	2-proz. Schleimstoff	10 ccm,	Wasser	10 ccm.

Das Reduktionsvermögen wurde mittels Mikromethode von SHAFFER und HARTMANN an 1 ccm der Probe bestimmt. Zum Nachweis des freien Sulfats wurden 5 ccm Probe entnommen, mit 2 Tropfen 20-proz. Salzsäure versetzt, filtriert, und an dem Filtrat wurde die Gegenwart des Sulfats mit $BaCl_2$-Lösung geprüft.

TABELLE XV
Einwirkung verschiedener Enzyme auf *Eisenia*-Schleim

Nr.	Versuchsdauer (Tage) 18		30		60	
	Freies SO_4	$n/200$-Thiosulfat ccm	Freies SO_4	$n/200$-Thiosulfat ccm	Freies SO_4	$n/200$-Thiosulfat ccm
1	—	0.40	—	0.54	....	
2	—	0.21	—	0.31	....	
3	—	0.78	—	1.28	....	
4	—	0.65	—	1.15	....	
5	—	4.82	—	5.91	—	7.34
6	—	0.46	—	0.64	—	0.51
7	—	0.29	—	0.47	....	
8	—	0.38	—	0.30	....	
9	—	0.30	—	0.42	....	
10	—	0.43	—	0.51	....	
11	—	0.25	—	0.30	....	

Daraus ist ersichtlich, dass der *Eisenia*-Schleim durch das Hepatopankreasenzym von *Haliotis* angegriffen wird, während alle andere geprüfte Fermente sich als darauf völlig unwirksam erwiesen. Die sulfatatische Wirksamkeit war in keinem der geprüften Enzympräparate wahrzunehmen.

d) Membranschleim von *Laminaria japonica*

In meiner vorläufigen Mitteilung(1) über die Schleimstoffe der Braunalgen ist gezeigt worden, dass der Schleim von *Laminaria angustata* auch einen Polysaccharidschwefelsäureester darstellt, wobei jedoch die chemische Natur seiner Kohlenhydratkomponente noch nicht klargestellt werden konnte.

Beim Fortführen jener Arbeit hat es sich gezeigt, dass mein damaliges Präparat mit einer nicht unbeträchtlichen Menge von Alginsäure beigemengt war, die in Form von wasserlöslichem Salz besonders in Markgeweben enthalten und bei der Extraktion zusammen mit dem Schleimstoff in Lösung gegangen war. Daher ist es mir genötigt, von echtem Schleimstoff auszugehen.

Inzwischen habe ich die Gelegenheit gehabt, aus dem frischen Thallus von *Laminaria japonica* eine geringe Menge vom eigentlichen Membranschleim darzustellen und damit einige Forschungen über seine chemische Natur durchzuführen.

(1) Bot. Mag. Japan, **51**, 549 (1937).

Darstellung

Der Thallus von *Laminaria japonica*, der frisch vom Meer herausgenommen war, wurde nach Abspülen mit Wasser zu Stücken geschnitten und in Wasser getaucht. Der aus dem Schnitt ausgeschiedene Schleim wurde mit einem Spatel gesammelt und in 50-proz. Äthanol, zu dem Salzsäure zu 0.5-proz. zugesetzt war, gebracht, wobei er zu weissem Masse erstarrte. Nach 3-tägigem Aufbewahren wurde das Produkt im Koliertuch gepresst und solange mit 96-proz. Alkohol gewaschen bis Cl-Ion aus der Waschflüssigkeit völlig verschwindet. Es wurde dann im Mörser zerrieben und durch Behandlung mit Aceton und Äther getrocknet.

Es ist sauer reagierend, indem das pH der etwa 1-proz. Lösung 3.0–3.1 ist.

Qualitative Reaktionen

Reduktionsvermögen	—
SELIWANOFFsche und PINOFFsche Reaktion nach Ketose	—
BIALsche Orcinreaktion nach Pentose	±
ROSENTHALERsche Reaktion nach Methylpentose	+
Naphthoresorcinreaktion nach Uronsäure	±
Freies SO_4 (mit $BaCl_2$)	–
Freies SO_4, nach Erhitzen mit HCl	+

Quantitative Bestimmung

Pentosan, Methylpentosan und SO_4:

0.3521 g Substanz, 0.0221 g Furfurolphloroglucid,
i.e. 0.0225 g (6.4%) Pentose (korrigiert für Uronsäure).
0.0441 g Methylfurfurolphloroglucid,
i.e. 0.0940 g (26.7%) Methylpentose.
0.3415 g $BaSO_4$,
i.e. 0.1405 g (39.9%) SO_4.

Uronsäure:

0.3730 g Substanz, 0.0041 g CO_2,
i.e. 0.0164 g (4.4%) Uronsäureanhydrid.

Hydrolyse

3.2021 g der Substanz wurden mit 120 ccm 2-proz. Schwefelsäure auf dem siedenden Wasserbade erhitzt und der Verlauf der Hydrolyse wurde nach dem Mikromethode von SHAFFER und HARTMANN verfolgt.

TABELLE XVI Hydrolyse des *Laminaria*-Schleims

Dauer der Hydrolyse Min.	Probe ccm	$n/200$-Thiosulfat ccm	Reduz. Zucker als Glucose (%)
65	1/4	10.09	21.6
140	1/6	9.68	30.7
310	1/8	8.55	36.5
410	1/8	9.41	39.8
460	1/8	9.27	39.2

Das Hydrolysat wurde mit Barytwasser neutralisiert und das Filtrat samt mit Waschwasser im Vakuum zum Sirup eingedampft. Er wurde dann mit siedendem 96-proz. Äthanol ausgezogen, filtriert und das Filtrat in Wasser gelöst.

Zu dem Hälfte der erhaltenen Zuckerlösung wurden 0.3 g *p*-Bromphenylhydrazin und 0.4 ccm Eisessig zugesetzt, schwach erwärmt und bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach etwa 5 Stunden wurde eine geringe Menge schwach bräunlicher Krystalle ausgeschieden, die, nach 20-stündigem Aufbewahren im Eisschrank filtriert und aus 30-proz. Äthanol umkrystallisiert, ein Produkt vom Schmelzpunkt 174–5° lieferten. Trotzdem der Schmelzpunkt dieser Substanz im Vergleich mit dem des Fukose-*p*-bromphenyl-hydrazons (178°) etwas niedriger ist, so mag das Produkt vielleicht damit identisch sein, weil der Schmelzpunkt bei der Mischprobe mit dem Fukose-*p*-bromphenylhydrazon (Schmp. 178°) keine Depression zeigte. Wegen Knappheit an Material konnte es nicht weiter gereinigt werden.

Das Filtrat aus den Hydrazonkrystallen wurde auf dem Wasserbade erwärmt, wobei eine geringe Menge gelber Nädelchen erzeugt wurde. Sie wurden filtriert und mit Wasser gewaschen. Das braun gefärbte Rohprodukt wurde, nach dem Trocknen im Exsikkator, mit Äther verrieben, wodurch die braune Farbe in Äther überging. Nach Filtrieren und Waschen mit Äther, wurde der Rückstand aus 10-proz. Äthanol umkrystallisiert, wobei sehr feine, gelbe Nädelchen vom Schmelzpunkt 158° erhalten wurden. Da der Zucker, dessen *p*-Bromphenylosazon bei 158° schmilzt, bisher noch nicht bekannt sind, so bedarf die Natur des vorliegenden Produktes noch Aufklärung.

Zu der anderen Hälfte der Zuckerlösung wurden 0.4 ccm Phenylhydrazin und 0.5 ccm Eisessig zugesetzt und bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach 5 Stunden wurden keine Hydrazonkrystalle gebildet, was auf die Abwesenheit der Mannose hindeutet.

Beim Erwärmen auf dem Wasserbade schieden sich gelbe Krystalle aus, die filtriert und mit Wasser und mit kaltem Aceton gewaschen wurden, wobei sich der Grossenteil in Aceton löste. Der Rückstand, welcher aus hellgelben Nadeln besteht, schmolz bei 203°. Somit stellte er Glucose-phenylosazon dar.

Da die Gegenwart von Mannose und Fructose ausgeschlossen ist, so kann man die Glucosazonbildung als Beweis für das Vorhandensein der Glucose betrachten.

Aus der Acetonwaschflüssigkeit wurde das andere Phenylosazon vom Schmelzpunkt 175–6° durch Fällen mit Wasser und Umkrystallisieren aus 50-proz. Äthanol erhalten. Es dürfte mit dem Fukosephenylosazon (Schmp. 177.5°) identisch sein.

Aus diesen Resultaten geht es hervor, dass der Schleimstoff von *Laminaria japonica* insofern dem von *Eisenia bicyclis* nahe steht, als er Glucose und Fukose als Kohlenhydratkomponente enthält. Da das Laminarin in meinem Schleimpräparat deshalb nicht beigemengt sein sollte, weil die Verarbeitung des Schleims zuerst in 50-proz. Alkohol, worin Laminarin löslich ist, durchgeführt worden war, so darf die nachgewiesene Glucose als der integrierende Bestandteil des Schleims angesehen werden.

Daneben ist das Vorhandensein einer geringen Menge von Pentose wahrscheinlich, deren chemische Natur jedoch nicht festgestellt werden konnte.

Was die Uronsäure anbetrifft, deren Gehalt in diesem Präparat zu 4.4% gefunden wurde, so halte ich es für wahrscheinlich, dass sie von der im Schleim beigemengten Alginsäure herrührt, da der Thallus von *Laminaria*-Arten besonders reich an wasserlöslichen Salzen der Alginsäure ist.

5. Besprechung

Aus den geschilderten Ausführungen ist zu ersehen, dass der Schleimstoff von drei Braunalgen, *Fucus evanescens, Eisenia bicyclis* und *Laminaria japonica*, im wesentlichen ein Polysaccharidschwefelsäureester ist.

Auf Grund, dass alle diese Schleimstoffe Substanzen von Säurenatur sind, kann man mit grosser Wahrscheinlichkeit darauf schliessen, dass die Schwefelsäure als saurer Ester an Kohlenhydrat gebunden ist.

Der Schleimstoff von *Fucus evanescens* kann als ein Polymeres von saurem Fukosemonosulfat angesehen werden, das von NELSON und CRETCHER aus *Macrocystis pyrifera* erhalten wurde.

Der Schleim von *Eisenia bicyclis* und von *Laminaria japonica* unterscheidet sich von dem *Fucus*-Schleim dadurch, dass der erstere ausser Fukose noch auch Glucose als Kohlenhydratkomponente enthält.

Daraus ergibt sich, dass der Membranschleim der verschiedenen Braunalgen nicht immer dieselbe Substanz ist. Allein steht es fest, dass die Fukose einen charakteristischen Bestandteil der Schleimstoffe darstellt.

Was die Frage anbetrifft, ob die Uronsäure sich auch als ein integrierender Bestandteil am Aufbau der Schleimstoffe beteiligt, wie die britischen Forscher behaupten, bin ich mit NELSON und CRETCHER geneigt zur Ansicht, dass die betreffende Substanz vielmehr als ein Verunreinigung betrachtet werden soll, weil es oben gezeigt worden ist, dass die Alginsäure, die in erheblicher Menge in der Zellhaut von Braunalgen vorkommt, beim Einlegen des Thallus in destillierten Wasser zum Teil in Lösung geht.

II. Die Zellmembran der Rotalgen

1. Einleitung

Wegen ihrer praktischen Wichtigkeit sind die Zellmembranbestandteile der Rotalgen bisher meist von der technischen Seite untersucht worden, wobei naturgemäss die verschiedenen Handelsprodukte, wie z.B. Agar, Carragheenschleim u.a. den Hauptgegenstand der Forschung bildeten. Jedoch sind solche Rohstoffe gewöhnlich nicht immer Produkte aus einer einzigen Alge, sondern verschiedene Arten nehmen daran Anteil, wie z.B. bei Agar der Fall ist, wo *Gelidium-*, *Gracilaria-*, *Ceramium-* und *Acanthopeltis*arten zum Ausgansmaterial dienen. Obschon die technisch-chemischen Kenntnisse auch zum rein wissenschaftlichen Zwecke zwar wichtigen Beitrag leisten können, so ist jedoch auch von biologischem Standpunkt aus wünschenswert, die Forschungen an den Produkten aus einer bestimmten Art vorzunehmen.

Von den Botanikern ist die Zellmembran der Rotalgen mit Hilfe der Färbungsreaktionen unter Mikroskop untersucht worden, wobei die chemische Natur der zu untersuchenden Membranstoffe meist kaum berücksichtigt worden ist.

Die Rotalgen lassen sich systematisch in zwei grosse Gruppen, Bangiales und Florideae, einteilen. Die Tatsache, dass ein grundlegender Unterschied in bezug auf sowohl die morphologischen Eigenschaften als auch den Fortpflanzungsmodus zwischen diesen Gruppen liegt, lässt uns mit Wahrscheinlichkeit darauf rechnen, dass es sich betreffs der chemischen Eigenschaften der Zellmembran auch eine wesentliche Differenz gibt.

Andererseits kann man erwarten, dass es auch irgendeinen Membranstoff gibt, der für die ganzen Rotalgen charakteristisch ist und somit dazu

dient, genau so wie die Chromatophorenfarbstoffe, die Rotalgen von den anderen Algengruppen zu unterscheiden.

Daher habe ich in der vorliegenden Arbeit beabsichtigt, mit den Vertretern von Bangiales und Florideae als Versuchsobjekt, die chemische Natur der Zellwandbestandteile von botanisch-systematischem Standpunkt aus näher zu erforschen.

Als Versuchsmaterialien kamen bei Bangiales *Porphyra tenera* und bei Florideae *Gigartina tenella* hauptsächlich zur Anwendung. Ausserdem wurden auch *Porphyra umbilicalis* f. *linealis*, *Carpopeltis crispata*, *C. cornea*, *Lomentaria catenata*, *Gymnogongrus* sp. und *Grateloupia* sp. mit herangezogen.

2. Zellmembran von *Porphyra tenera*

a) Allgemeines

Porphyra tenera ist das Material der in Japan hochgeschätzten Delikatesse („Nori, Asakusanori“) und wird in grossem Umfange, besonders in Bucht von Tokyo, kultiviert. Es stellt eines der wichtigsten Wasserprodukte in Japan dar, dessen jährliche Produktion etwa 12 Millionen Yen beträgt.

Daher sind die Lebensbedingungen, Kulturmethoden u.a. dieser Alge schon seit langem von der praktischen Seite aus eingehend erforscht worden, wodurch erhebliche Verbesserungen zur Herstellung der Handelsprodukte erzielt wurden.

Bezüglich der Lebensgeschichte wurde auch neuerdings ein grosser Fortschritt gemacht.[(1)]

Im Gegensatz dazu sind wir hinsichtlich der Zellmembranbestandteile nur wenig unterrichtet.

Von K. OSHIMA und B. TOLLENS[(2)] wurde zuerst die Produkte untersucht, die bei der Hydrolyse der Gesamtalge erzeugt wurden. Dabei haben diese Autoren daraus *d*-Mannose und einen optisch inaktiven Zucker isoliert, der, nach dem Schmelzpunkt seines Phenylhydrazons sowie nach der Ausbeute der bei der Oxydation mit Salpetersäure gebildeten Schleimsäure, als *d,l*-Galaktose aufgefasst wurde. Ausserdem wurde die Existenz der Glucose durch Isolierung des sauren Kaliumsalzes der Zuckersäure nachgewiesen und das Vorhandensein der Fukose und der Fruktose wurde auch durch Bildung des Methylfurfurols bzw. positive SELIWANOFFsche Reaktion wahrscheinlich gemacht.

---

(1) S. UEDA in Bull. Jap. Soc. Sci. Fisheries, **6**, 91 (1937); H. KUNIEDA in J. Coll. Agr. Imp. Univ. Tokyo, **14**, No. 5 (1939).

(2) Ber. Dtsch. Chem. Ges., **34**, 1422 (1901).

An den verschiedenen Handelswaren mit wechselnden Preisen, haben Y. OKUDA und S. NAKAMURA[1] sowie H. MATSUI[2] den Gehalt an einigen Konstituenten, wie Stickstoff, Pentosan, Methylpentosan, Rohfaser, reduzierendem Zucker nach der Hydrolyse u.a., ermittelt, wobei jedoch die chemische Natur der einzelnen Kohlenhydrate nicht untersucht wurde.

Mit Hilfe der mikrochemischen Färbungsreaktion wurde die Zellhaut einiger Bangiaceen von H. KYLIN[3] untersucht. Er zeigte, dass die Cellulosereaktion mit Chlorzinkjod sowie mit Jod und Schwefelsäure bei *Bangia fuscopurpurea* und *Porphyra laciniata* nicht wahrgenommen wurde, während sie bei *Erythrotrichia ceramicola* positiv ausfiel.

Die oberflächliche Schicht der Zellmembran von verschiedenen Algen ist bisher ohne Rücksicht auf die chemische Natur als kutikulaartig angesehen worden.[4] Vom physiologischen Standpunkt aus wäre es sehr auffallend, wenn die für Wasser impermeable Kutikularmembran wirklich die Thallusoberfläche überzöge.

Da man aus diesen spärlichen Angaben nichts näheres über die Zellmembran dieser Alge kennenzulernen vermag, so habe ich mich bemüht, nicht nur die chemische Natur der einzelnen Bestandteile, sondern auch die Lokalisation derselben in der Zellhaut aufzuklären. Hierbei wurden die folgenden Punkte besonders berücksichtigt.

1) Im Hinblick auf die KYLINsche Angabe einerseits, dass die Zellhaut von *Porphyra laciniata* frei von Cellulose ist und auf den eigenen Befund andererseits, dass die meisten Florideen, wie unten ausführlich behandelt wird, echte Cellulose führen, scheint es mir genötigt, festzustellen, ob auch bei *Porphyra tenera* eigentliche Cellulose wirklich vorkomme oder nicht. Zur Entscheidung der Frage ist die mikrochemische Methode, wie sie von KYLIN angewendet wurde, nicht ausreichend, weil das Ausbleiben der Cellulosereaktionen nicht immer der eindeutige Beweis für das Fehlen der Cellulose ist, da die beigemengten Substanzen manchmal die Färbung verhindern.

2) Die Frage bedarf auch der Aufklärung, von welchen Zellbestandteilen die von OSHIMA und TOLLENS nachgewiesenen Zuckerarten stammten. Falls die Muttersubstanzen dieser Zucker Membranstoffe sind, so ist die Lokalisation derselben in der Zellhaut festzustellen.

Zum chemischen Studium wurden zumeist die getrockneten Materialien im Handel und zum mikrochemischen die frische Algen herangezogen.

---

(1) J. Coll. Agr. Imp. Univ. Tokyo, **5**, 339 (1916).
(2) Ebenda, **5**, 391 (1916).
(3) Z. physiol. Chem., **94**, 337 (1915).
(4) F. OLTMANNS, Morphologie u. Biologie d. Algen, 2 Aufl. (1923), Bd. III, S. 1; K. OKAMURA, Soruikeitogaku, S. 280 (1930).

Wie unten ausführlich behandelt, kann man die Zellmembran von *Porphyra* schematisch darstellen, wie Fig. 3 zeigt.

A ist eine äusserste Membran, die sowohl physikalisch als auch chemisch am festesten ist und gewöhnlich als Kutikula bezeichnet wird. B ist eine Interzellularsubstanz, die in destilliertem Wasser etwas aufquillt. Diese Interzellularsubstanz lässt sich mit heissem Wasser extrahieren, wobei die Lösung nicht so viskös ist wie der Wasserauszug der meisten Florideen. C ist eine innerste Membran, die unmittelbar das Protoplast umgibt.

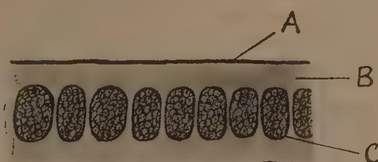


Fig. 3. Querschnitt des Thallus von *Porphyra tenera*. Erklärung im Text.

Dank der verschiedenen Widerstandsfähigkeit dieser drei Membranbestandteile gegenüber heissem Wasser und verdünnten Säuren, ist man imstande, durch geeignete Arbeitsweise die chemische Natur dieser drei Membranen getrennt zu untersuchen. Dabei erwies sich, dass die Interzellularsubstanz B von den festeren Häuten, A und C, leicht abgetrennt wird, während die Trennung der A-Membran von C mit Schwierigkeit durchzuführen ist.

Analyse der Gesamtalge.

An der völlig getrockneten Alge wurden die folgenden Bestimmungen ausgeführt.

TABELLE XVII
(Die Zahlen bedeuten % an Trockensubstanz)

Asche	12.06 (SO_4 1.46)
Gesamt-N	5.78
Rohfaser	6.98
Pentosan	2.25
Methylpentosan	0.86
Uronsäureanhydrid	1.94
Organisches SO_4	6.08
Gesamtzucker (als Galaktose)	31.2

Anmerkung über Methoden.

Gesamt-N: nach KJELDAHL.

Rohfaser: nach derselben Methode wie die Cellulosebestimmung bei den Braunalgen.

Pentosan und Methylpentosan: nach KRÖBER-MAYER-TOLLENS; der Pentosangehalt wurde unter Einbeziehung von Uronsäuregehalt berechnet.

Organisches Sulfat: nach Erhitzen mit HCl.

Gesamtzucker: nach BERTRAND, nach Hydrolyse auf dem Wasserbade mit 3-proz. H_2SO_4.

b) Interzellularsubstanz

Wie oben erwähnt, lässt sich die Interzellularsubstanz dieser Alge mit heissem Wasser fast quantitativ ausziehen, ohne dass die anderen Zellmembranbestandteile mitgerissen werden.

200 g der lufttrockenen Alge (Wassergehalt 12.2%) wurden mit 2 l 96-proz. Äthanol 3.5-stundenlang auf dem Wasserbade gekocht. Der dunkelgrüne alkoholische Auszug wurde scharf abgepresst und der Rückstand 10-mal je mit 5 l Wasser auf dem siedenden Wasserbade extrahiert. Die vereinigten Auszüge wurden durch Faltenfilter filtriert, im Vakuum auf etwa 500 ccm eingeengt, dann in 4 l 96-proz. Äthanol, der Salzsäure zu 1-proz. enthielt, unter heftigem Umrühren gegossen, wobei die Substanz zu einer grauweissen Masse erstarrte. Nach dem Stehen übernacht wurde der Niederschlag koliert, mit angesäuertem Alkohol zerrieben und filtriert. Den Rückstand löste man in 400 ccm Wasser und trennte eine geringe Menge unlöslicher Substanzen durch Zentrifugieren ab. Aus der nahezu klaren Lösung wurde die Substanz mit 5 l salzsäurehaltigem Alkohol gefällt und der Niederschlag pulverisiert und mit Äthanol und Aceton zur Cl-Freiheit gewaschen. Schliesslich wurde das Produkt zuerst mit einem Gemisch von Aceton und Äther (1:1), dann mit Äther kurz erwärmt und im Exsikkator getrocknet. Es wurden 42 g der exsikkatortrockenen Substanz erhalten.

An einer anderen Portion des Ausgangsmaterials wurde der Gehalt an dieser Interzellularsubstanz bestimmt. Aus 9.92 g der völlig getrockneten Alge erhielt man durch 14-malige Extraktion je mit 300 ccm Wasser 3.62 g der wasserfreien Substanz. Mithin beträgt der Gehalt 36.5% der Gesamtalge.

Analyse der Interzellularsubstanz

TABELLE XVIII

(Die Zahlen bedeuten % an Trockensubstanz)

Asche	9.26
Gesamt-N	2.11
Pentosan	1.23
Methylpentosan	0
Organisches SO_4	16.3
Gesamtzucker (als Galaktose)	67.0

Das Produkt ist ein grauweisses Pulver, das in Wasser löslich ist, jedoch nicht ohne sehr schwache Trübung. Es reagiert schwach sauer, indem das pH der 2-proz. Lösung als 3.1 ermittelt wurde.

Hydrolyse

35 g (Trock.-gew. 32.8 g) der Substanz wurden in 1200 ccm 3-proz. Schwefelsäure gelöst und auf dem siedenden Wasserbade erhitzt. Als die Zuckermenge in dem Hydrolysat nicht mehr zunahm, was 3.5 Stunden erfordert, wurde die Lösung filtriert und mit Barytwasser und Bariumcarbonat neutralisiert. Die von Bariumsulfat und Überschuss von

Bariumcarbonat abfiltrierte Lösung wurde mit Tierkohle entfärbt, unter vermindertem Druck zum dünnen Sirup eingedampft und in 1 l 96-proz. Alkohol unter Umrühren hineingegossen, wobei nur eine geringe Menge von Fällung auftrat. Nach dem Stehen übernacht wurde der Niederschlag abfiltriert und das alkoholische Filtrat zum dicken Sirup eingedampft, der in Wasser gelöst und auf 200 ccm aufgefüllt wurde.

Der beim Zusatz von Alkohol entstandene Niederschlag zeigte keine positive Naphthoresorcinreaktion, was auf das Fehlen der Uronsäurekomponente hinweist.

Die erhaltene Zuckerlösung ergab folgende qualitative Reaktionen:

SELIWANOFFsche und PINOFFsche Reaktion nach Ketose	−
Phloroglucinreaktion nach Pentose	+
BIALsche Orcinreaktion nach Pentose	±
ROSENTHALERsche Reaktion nach Methylpentose	−

Die Zuckerlösung war schwach rechtsdrehend und lieferte bei der Oxydation mit Salpetersäure eine beträchtliche Menge Schleimsäure vom Schmelzpunkt 220°.

150 ccm der Zuckerlösung wurde im Vakuum auf etwa 70 ccm eingeengt, mit einem Gemisch von 15 ccm Phenylhydrazin, 12 ccm Eisessig und 40 ccm Wasser versetzt und 3 Stdn. bei Zimmertemperatur und weiter noch 3 Stdn. im Eisschrank stehen gelassen, wobei sich eine grosse Menge gelbliche Krystalle ausschieden. Sie wurden filtriert, stark abgesaugt, mit eiskaltem Wasser gewaschen und zweimal aus 96-proz. Äthanol umkrystallisiert, wobei die Krystallisation durch Zusatz von wenig Äther stark beschleunigt werden konnte. Das Produkt stellte nun kanaliengelbe Schüppen vom Schmelzpunkt 159° dar, der mit demjenigen des Galaktosephenylhydrazons übereinstimmt.

Drehung:

$$[\alpha]_D^{24} = \frac{0° \times 100}{2.035 \times 1} = 0° \quad \text{(in Wasser)}.$$

Selbst nach 20-stündigem Stehen wurde keine Veränderung des Drehungswinkels beobachtet. Da die spezifische Drehung des *d*-Galaktosephenylhydrazons von A. HOFFMANN[1] als $[\alpha]_D^{20} = -21.4°$ (in Wasser) angegeben wurde, so scheint die vorliegende Verbindung ein Derivat der racemischen Galaktose zu sein.

Aus diesem Phenylhydrazon wurde der freie Zucker mit dem üblichen Benzaldehydverfahren dargestellt. Das einmal aus Wasser umkrystallisierte Produkt schmolz bei 143–4°. Als Schmelzpunkt der *d,l*-Galaktose gaben C. NEUBERG und J. WOHLGEMUTH[2] 143–4° an. Beim weiteren

(1) Ann. Chem., **366**, 277 (1909).
(2) Z. physiol. Chem., **36**, 224 (1902).

Umkrystallisieren aus 96-proz. Alkohol stieg der Schmelzpunkt auf 164°, der mit dem von E. O. v. LIPPMANN[3] für *d,l*-Galaktose angegebenen (163°) übereinstimmt.

Drehung:

$$[\alpha]_D^{24} = \frac{0^\circ \times 100}{5.642 \times 1} = 0^\circ \quad \text{(in Wasser)}.$$

Nach 22 Stdn. wurde keine Veränderung des Drehungswinkels beobachtet.

α-Methylphenylhydrazon

0.4 g des Zuckers wurden in 5 ccm Wasser gelöst mit 0.3 ccm *α*-Methylphenylhydrazin und Alkohol zur klaren Lösung versetzt. Bald schied sich eine beträchtliche Menge Hydrazonkrystalle aus, die nach 3-stündigem Stehen filtriert, mit Alkohol gewaschen und aus 30-proz. Alkohol zu farblosen Nadeln vom Schmelzpunkt 185° umkrystallisiert wurden. Auch ist der Schmelzpunkt des *d,l*-Galaktose-*α*-methylphenylhydrazons von C. NEUBERG und J. WOHLGEMUTH[1] als 183° gefunden worden.

Oxydation mit Salpetersäure

Die Ausbeute der Schleimsäure, die bei der Oxydation des erhaltenen Zuckers mit der Salpetersäure vom sp. Gew. 1.15 erzeugt wird, wurde nach der Vorschrift von A. W. VAN DER HAAR[2] bestimmt.

0.3246 g	Sbst. gaben	0.2297 g Schleimsäure.
	Ausbeute	70.8 %.
	Theoretischer Wert	72.3 %.

Aus allen diesen Resultaten steht ausser allem Zweifel fest, dass der erhaltene Zucker reine razemische Galaktose darstellt.

Wie oben erwähnt, erwies sich das Hydrolysat der wasserlöslichen Substanz als schwach rechtsdrehend, was auf das Vorhandensein anderer Zuckerarten ausser der optisch inaktiven Galaktose hindeutet. Zum Nachweis derselben wurde das Filtrat aus dem *d,l*-Galaktosephenylhydrazons mit 15 ccm Benzaldehyd und 50 ccm 96-proz. Äthanol versetzt und 3.5 Stdn. auf dem Wasserbade erwärmt. Nach dem Erkalten wurde das ausgeschiedene Benzaldehydphenylhydrazon abfiltriert und das Filtrat im Vakuum zum dicken Sirup eingedampft. Dazu wurde Wasser zugesetzt und die von dem nochmals ausgeschiedenen Benzaldehydhydrazon abfiltrierte Lösung wurde auf etwa 40 ccm eingedampft. Darauf liess man folgende Phenylhydrazine einwirken.

(1) Ber. Dtsch. Chem. Ges., **55**, 3088 (1922).
(2) Z. physiol. Chem., **36**, 224 (1902).
(3) Biochem. Z., **81**, 263 (1917); A. W. VAN DER HAAR, Anleitung zum Nachweis, zur Trennung u. Bestimmung d. Monosaccharide u. Aldehydsäuren, S. 123 (1920).

1. Zu 4 ccm der Lösung wurden 0.2 g. *p*-Bromphenylhydrazin und 6 Tropfen Eisessig zugesetzt, schwach erwärmt und bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Die ausgeschiedenen Hydrazonkrystalle wurden nach 3-tägigem Stehen filtriert, mit Alkohol gewaschen und aus Wasser zu schwachbräunlichen Nadeln vom Schmelzpunkt 167–8° umkrystallisiert. Der Schmelzpunkt stimmt mit dem des *d*-Galaktose-*p*-Bromphenylhydrazons überein.

2. Zu 4 ccm der klaren Lösung wurden 6 Tropfen *α*-Methylphenylhydrazin und Alkohol zugesetzt. Bald schied sich Hydrazon aus, das, nach zweimaligem Umlösen aus 30-proz. Alkohol, bei 187–8° schmolz. Mischschmelzpunkt mit dem *d*-Galaktose-*α*-Methylphenylhydrazon vom Schmp. 190° wies keine Depression auf.

3. 4 ccm der Zuckerlösung wurden mit einem Gemisch von 0.3 ccm Phenylhydrazin, 0.4 ccm Eisessig und 6 ccm Wasser versetzt und 4 Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrt, während welcher Zeit keine Hydrazonkrystalle erzeugt wurden. Beim Erwärmen auf dem Wasserbade trat gelbes Osazon auf, das nach 40 Minuten filtriert, mit Wasser und mit eiskaltem Aceton nachgewaschen wurde, wobei eine nicht unbeträchtliche Menge des Produkts in Acetonlösung überging. Der Rückstand stellte gelbe, etwas breite Nadeln dar, die bei 187–8° schmolzen, übereinstimmend mit dem Schmelzpunkt von Galaktosephenylosazon.

Aus diesem Versuche ist zu ersehen, dass das Vorhandensein der Galaktose wahrscheinlich, dagegen das der Glucose, Mannose, Fukose und Arabinose zweifelhaft ist.

Im Hinblick darauf, dass *d*-Galaktose den Hauptbestandteil der Interzellularsubstanz von manchen Florideen darstellt (siehe unten), erscheint es uns nicht unwahrscheinlich, dass die rechtsdrehende Galaktose auch als Komponente der Interzellularsubstanz von Bangiaceen vorkommt. Deshalb wurde versucht, aus der obigen Zuckerlösung die Galaktose mit Hilfe von *α*-Methylphenylhydrazin quantitativ zu trennen.

Dazu wurde der Rest der Zuckerlösung mit 1.2 ccm *α*-Methylphenylhydrazin in 30 ccm Alkohol und 0.2 ccm Eisessig versetzt, schwach erwärmt und 4-stundenlang bei Zimmertemperatur und dann übernacht im Eisschrank aufbewahrt. Darnach wurden die ausgeschiedenen Krystalle filtriert, scharf abgesaugt, mit gekühltem Äthanol gewaschen und aus 30-proz. Alkohol umkrystallisiert, wobei sich schwach gelbliche Schüppen vom Schmelzpunkt 184° ergaben. Ausbeute: 1.57 g.

1.5 g der erhaltenen Substanz wurden durch Umsetzung mit Benzaldehyd in freien Zucker übergeführt. Der erhaltene Zucker, nach Umkrystallisieren aus 90–proz. Äthanol, schmolz bei 166°. C. TANRET[1] gab den Schmelzpunkt von *d*-Galaktose als 168°.

(1) Bull. Soc. Chim. France, (3) **21**, 1066 (1902).

Drehung:

0.1628 g der Substanz wurden in 5.0 ccm Wasser gelöst; l = 1, t = 19°. Die Mutarotation wurde beobachtet.

Anfangsdrehung (nach 3.5 Minuten) $\alpha_D = +3.91°$,
$[\alpha]_D^{19} = +120.1°$.

Enddrehung (nach 21 Stunden) $\alpha_D = +2.59°$,
$[\alpha]_D^{19} = +79.5°$.

Bei der Oxydation mit Salpetersäure wurde die Schleimsäure vom Schmelzpunkt 219° erzeugt.

Aus diesen Ergebnissen ist es nicht zu zweifeln, dass der vorliegende Zucker reine *d*-Galaktose darstellt.

An Hand des Befundes, dass die Interzellularsubstanz nicht nur *d,l*- sondern auch *d*-Galaktose als Komponente enthält, scheint es mir wünschenswert, die Gesamtmenge der *d,l*- und *d*-Galaktose im Hydrolysat sowie auch das Verhältnis, *d,l*-Galaktose: *d*-Galaktose, festzustellen.

Zu diesem Zwecke wurde die Gesamtgalaktose nach der Methode von C. NEUBERG durch Fällen mit α-Methylphenylhydrazin bestimmt und die *d*-Galaktose an der aus dem genannten Hydrazon regenerierten Zuckerlösung polarimetrisch ermittelt.

6.34 g der getrockneten Interzellularsubstanz wurden durch Erhitzen mit 100 ccm 3-proz. Schwefelsäure hydrolysiert, woraus 50.0 ccm einer wässrigen Zuckerlösung, die über alkoholische Lösung gereinigt war, erhalten wurden.

Gesamtzucker, nach BERTRAND bestimmt:
1.0 ccm 30.1 mg (als Galaktose).

Mithin war die Zuckerkonzentration 6.02%.

Gesamtgalaktose:
10.0 ccm 0.8897 g Galaktose-α-methylphenylhydrazon,
0.5641 g Galaktose.

Bezogen auf den Gesamtzucker, 93.7%.

Aus dem Rest der obigen Zuckerlösung wurde das Gemisch von α-Methylphenylhydrazone der *d,l*- und *d*-Galaktose erhalten und durch Umlösen aus 30-proz. Äthanol zu schneeweissen Krystallen vom Schmp. 182° gereinigt.

2.1 g dieses Hydrazons wurden mittels des Benzaldehydverfahrens in 10 ccm der wässrigen Zuckerlösung übergeführt.

Gesamtzucker, nach BERTRAND bestimmt:
1.0 ccm 8.14 mg (als Galaktose).

Drehung:
$\alpha_D^{23} = +0.69°$.

Da die spezifische Drehung der *d*-Galaktose

$$[\alpha]_D = +80.5°$$

ist, so ist die Konzentration derselben

$$+80.5° = \frac{+0.69° \times 100}{p \times 1}, \qquad p = 0.857.$$

Aus der Gesamtkonzentration der *d,l*- und *d*-Galaktose berechnet sich das Verhältnis,

d,l-Galaktose : *d*-Galaktose = 100 : 11.8.

Hierbei bleibt die Frage noch festzustellen, entweder ob das gefundene Galaktosegemisch als eine Mischung von *d,l*- und *d*-Galaktose oder ob es als ein Gemisch von *d*- und *l*-Galaktose aufzufassen ist.

Auf Grund des beträchtlichen Löslichkeitsunterschieds, der zwischen *d,l*- und *d*-Galaktose besteht, sind C. NEUBERG und J. WOHLGEMITH[1] der Meinung, dass die inaktive Galaktose als ein wahrer Razemkörper anzusehen ist. Wie oben erwähnt, hat auch eigener Versuch gezeigt, dass die razemische und die rechtsdrehende Galaktose sich gegenüber dem Phenylhydrazin voneinander etwas verschieden verhalten, indem nur die erstere unter den angegebenen Versuchsbedingungen durch das genannte Reagens niedergeschlagen wird. Auch in bezug auf die Bildungsweise des α-Benzylphenylhydrazons bemerkt man dazwischen einen ausgeprägten Unterschied, wie aus dem folgenden Versuch ersichtlich.

d-Galaktose-α-benzylphenylhydrazon

0.4 g *d*-Galaktose (Schmp. 167°) in 5 ccm Wasser wurden mit 0.5 ccm von α-Benzylphenylhydrazin in 8 ccm 96-proz. Alkohol schwach erwärmt und bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach 2 Tagen wurde kein Hydrazon erzeugt. Bei Zugabe von Wasser bis zur beginnenden Trübung erstarrt das Gemisch zu einem Gallert, das beim Stehen übernacht in Krystalle umgewandelt wurde. Beim Umkrystallisieren aus 75-proz. Äthanol scheidet sich das Produkt zunächst immer als Gallert aus und erst beim Stehen werden die Krystalle ausgebildet. Schmp. 154°.

d,l-Galaktose-α-Benzylphenylhydrazon

0.4 g *d,l*-Galaktose (Schmp. 163–4°) wurden in ganz derselben Weise wie bei dem optisch aktiven Zucker, behandelt. Nach 2 Tagen begannen lange, grosse Nadeln sich auszuscheiden, die nach Stehen von weiteren 2 Tagen filtriert und aus 75-proz. Äthanol umkrystallisiert wurden, wobei die Gallertbildung nie beobachtet wurde. Jedenfalls lässt es sich viel leichter umkrystallisieren als die *d*-Galaktoseverbindung. Schmp. 158°.

---

(1) Z. physiol. Chem., **36**, 224 (1902).

Somit möchte ich auch der Ansicht von NEUBERG und WOHLGEMUTH beistimmen, dass die *d,l*-Galaktose als wahrer Razemkörper anzusehen ist.

Bezüglich der anderen Zuckerarten, die bei der Hydrolyse dieser Substanz neben *d,l*- und *d*-Galaktose entstehen, wurde nichts näheres erforscht, da deren Gehalt im Hydrolysat (6.3%) gering war.

Weiterhin ist mir auch gelungen, diese Interzellularsubstanz einfach durch geeignete Einwirkung verdünnter Mineralsäure von den anderen Zellwandbestandteilen getrennt zu untersuchen, wobei nur die erstere verzuckert wird, während die letzteren fast unangegriffen bleiben.

Dazu wurden 100 g der lufttrockenen Alge (Wassergehalt 12.2%) mit 1500 ccm 3-proz. Schwefelsäure übergossen und 6-stundenlang auf dem siedenden Wasserbade erhitzt. Durch diese Behandlung wird die Gewebestruktur des Thallus zerstört, indem die Interzellularsubstanz gelöst und die anderen Zellwände, A und C in Fig. 3, losgetrennt werden. Dass die beiden letzteren Zellmembranen dabei chemisch kaum angegriffen werden, kann man sowohl aus der mikroskopischen Prüfung als auch aus der Untersuchung des Hydrolysats schliessen.

Aus dem erhaltenen Hydrolysat wurde die wässrige Zuckerlösung, die über alkoholische Lösung gereinigt war, gewonnen und den folgenden Prüfungen unterworfen.

SELIWANOFFsche und PINOFFsche Reaktion nach Ketose	—
Phloroglucin- und Orcinreaktion nach Pentose	+
ROSENTHALERsche Reaktion nach Methylpentose	+

Zu einer Portion der Lösung wurden Phenylhydrazin und Essigsäure zugesetzt und 5-stundenlang bei Zimmertemperatur stehen gelassen, wobei kein Mannosephenylhydrazon erzeugt wurde. Nach dem Erwärmen auf dem Wasserbade wurde gelbes Phenylosazon gebildet, das, nach Umkrystallisieren aus 50-proz. Äthanol als Galaktosephenylosazon vom Schmelzpunkt 186° erkannt wurde.

Eine andere Portion der Zuckerlösung wurde auf 1/3 ihres Volumens eingeengt und dazu Phenylhydrazin und Essigsäure zugesetzt. Die bald ausgeschiedenen Hydrazonkrystalle wurden nach dem Stehen übernacht filtriert und aus 30-proz. Äthanol umkrystallisiert, wobei sie als Galaktosephenylhydrazon vom Schmelzpunkt 158° identifiziert wurden.

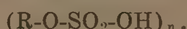
Der Rest der Zuckerlösung wurde mit *α*-Methylphenylhydrazin und Alkohol zur klaren Lösung versetzt. Nach kurzem Stehen schied sich eine beträchtliche Menge Hydrazonkrystalle aus, die abgesaugt und zweimal aus 30-proz. Äthanol zu den breiten Nadeln vom Schmelzpunkt 181° umkrystallisiert wurden. Bei der Mischprobe mit dem *d,l*-Galaktose-*α*-methylphenyl-hydrazon zeigte sich keine Depression des Schmelzpunkts.

Aus dem Filtrat dieses α-Methylphenylhydrazons wurde der Überschuss von Methylphenylhydrazin mittels Benzaldehyds entfernt und die resultierende Zuckerlösung, nachdem man das Benzaldehyd ausgeäthert hatte, wurde erneut mit Phenylhydrazin und Essigsäure versetzt. Beim Erwärmen auf dem Wasserbade trat eine sehr geringe Menge von gelben Osazonkrystallen auf, die nach Umkrystallisieren aus 50-proz. Alkohol bei 175–7° schmolzen. Mischschmelzpunkt mit dem Galaktosephenylosazon vom Schmp. 178° ergab 176°. Das Glucosephenylosazon wurde hierbei nicht erzeugt.

Aus diesen Resultaten steht aller Wahrscheinlichkeit nach fest, dass die Produkte, die direkt durch Hydrolyse der Gesamtalge mit 3-proz. Schwefelsäure erhalten wurden, von den Hydrolysenprodukten der isolierten Interzellularsubstanz im wesentlichen nicht zu unterscheiden sind. Nämlich liessen sich unter solchen Bedingungen der Säureeinwirkung Spaltprodukte von A- und C-Membran, wie Mannose, Glucose und Fructose, die unten ausführlich behandelt werden, nicht nachweisen.

Schwefelsäureester

Wie oben angegeben, enthält die Interzellularsubstanz 16.3% von organisch gebundener Schwefelsäure. Da die Interzellularsubstanz 36.5% der Gesamtalge ausmacht, so entspricht dieser Schwefelsäuregehalt $16.3 \times 36.5 = 5.90\%$ der Gesamtalge. Vergleicht man diesen Wert mit dem direkt ermittelten Schwefelsäuregehalt der Gesamtalge (6.08%), so kann man mit grosser Wahrscheinlichkeit schliessen, dass die Schwefelsäureverbindung dieser Alge ausschliesslich in der Interzellularsubstanz enthalten ist. Dies legt natürlich die Annahme nahe, dass die Schwefelsäure an *d,l*- oder *d*-Galaktose gebunden sei. Ferner lässt sich die Säurenatur der Interzellularsubstanz vermuten, dass die Schwefelsäure, wenigstens zum Teil, als saurer Ester von der folgenden Formel vorliegt, wobei R Kohlenhydratkomplex bedeutet, der aus *d,l*- und *d*-Galaktose u.a. besteht:



$$(R\text{-}O\text{-}SO_2\text{-}OH)_n.$$

Verhalten der Interzellularsubstanz gegen Enzyme

Die Spaltbarkeit dieser Substanz durch verschiedene Enzympräparate wurde untersucht, wobei auch darauf berücksichtigt wurde, ob die enzymatische Abspaltung des Sulfats neben der carbohydratatischen Wirkung stattfindet. Hierzu wurden folgende Fermentpräparate herangezogen.

Darstellung und Reinigung der einzelnen Fermentpräparate erfolgten ganz in derselben Weise wie bei der enzymatischen Spaltung des *Eisenia*-Schleimstoffs.

1) Malzenzym.
2) Takadiastase.

3) Pankreasenzym.
4) Ferment aus Hepatopankreas von *Haliotis gigantea.*
5) Ferment aus Hepatopankreas von *Aplysia punctata.*
6) Ferment aus *Bacillus fluorescens liquefaciens.*
7) Ferment aus *Bacillus coli.*

Substrat. 1.0-proz. wässrige Lösung der Interzellularsubstanz, die mit verdünnter Natronlauge zu pH 6.5 gestellt wurde. Bei jedem Ansatz wurden Substrat- und Enzymlösung im Verhältnis von 1:1 (in Volumen) vermischt.

Zum Prüfen der Carbohydrasewirkung wurden aus jedem Reaktionsgemisch 2 ccm Probe entnommen, mit 1 ccm 10-proz. Trichloressigsäurelösung versetzt und filtriert. An dem Filtrat wurde das Reduktionsvermögen nach der Mikromethode von SHAFFER und HARTMANN bestimmt. Die sulfatatische Wirkung jedes Enzyms wurde nur qualitativ und zwar mit Hilfe des Bariumchlorids und bei einigen Fällen ausserdem mit Benzidinhydrochlorid geprüft.

Aus diesen Resultaten ist zu ersehen, dass die Enzympräparate aus dem Hepatopankreas von beiden hervivoren Mollusken, *Haliotis gigantea* und *Aplysia punctata,* sowohl carbohydratatische als auch sulfatatische Wirkung aufzeigten, während Malzextrakt, Takadiastase, Pankreasenzym sowie Fermente aus beiden Bakterien weder verzuckerndes Enzym noch Sulfatase führen.

Um die durch *Haliotis*-Enzym bewirkte Hydrolyse quantitativ zu erfassen, wurde folgender Versuch angestellt.

Ansatz:

3.1855-proz. Lösung der Interzellularsubstanz	40 ccm,
Enzymlösung aus *Haliotis*-Hepatopankreas	40 ccm.

Versuchstemperatur 30°.

Nach der Versuchsdauer von 40 Tagen wurde die Lösung filtriert und das Reduktionsvermögen nach Reinigung mit Trichloressigsäure, nach BERTRAND bestimmt.

5.0 ccm der ursprünglichen Lösung: 4.86 ccm 0.1 n-$KMnO_4$.
16.2 mg Zucker als Galaktose.

Daraus berechnet sich die Spaltung der Kohlenhydratkomponente zu 30.4%.

Zur Bestimmung des abgespaltenen Sulfats wurden 25 ccm der Lösung mit 5 ccm 20-proz. Trichloressigsäure versetzt, die gebildete Fällung filtriert und mit Wasser gewaschen. Das vereinigte Filtrat ergab 0.0124 g an freien SO_4, entsprechend 3.14% der angewandten Substanz. Aus dem Gehalt an organischem Sulfat bei der Interzellularsubstanz (16.3%) wird das abgespaltene Sulfat zu 19.3% berechnet.

TABELLE XIX

Einwirkung verschiedener Fermentpräparate auf Interzellularsubstanz

Nr.	Enzym	Versuchsdauer Tage	Probe ccm	n/200-Thiosulfat ccm	Freies SO_4	Versuchsdauer Tage	Probe ccm	n/200-Thiosulfat ccm	Freies SO_4	Versuchsdauer Tage	Probe ccm	n/200-Thiosulfat ccm	Freies SO_4
1	Malz.	7	2/3	1.54	—	21	2/3	2.40	—	37	2/3	3.80	—
	„ ohne Sbstr.	„	„	1.31	—	„	„	2.05	—	„	„	3.45	—
2	Takadiastase	7	2/3	0.59	—	21	2/3	0.81	—	37	2/3	1.56	—
	„ ohne Sbstr.	„	„	0.41	—	„	„	0.70	—	„	„	1.14	—
3	Pankreas	7	3/2	0.52	—	21	3/2	0.82	—	37	3/2	1.45	—
	„ ohne Sbstr.	„	„	0.19	—	„	„	0.40	—	„	„	0.78	—
4	*Haliotis*	4	2/3	8.46	+	13	2/3	10.14	+	31	2/3	13.01	+
	„ ohne Sbstr.	„	„	0.57	—	„	„	0.65	—	„	„	0.55	—
5	*Aplysia*	4	2/3	4.13	+	13	2/3	6.31	+	31	2/3	8.36	+
	„ ohne Sbstr.	„	„	0.71	—	„	„	0.62	—	„	„	0.55	—
6	*Bac. fl. liq.*	23	3/2	0.34	—	71	3/2	0.23	—	....	....	....	....
	„ ohne Sbstr.	„	„	0.40	—	„	„	0 24	—	....	....	....	....
7	*Bac. coli.*	23	3/2	0.41	—	71	3/2	0.36	—	....	....	....	....
	„ ohne Sbstr.	„	„	0.21	—	„	„	0.10	—	....	....	....	....
8	Ohne Enzym	37	2/3	0.27	—	....	....	....	....	....	....	....	....

Versuchstemperatur 30°.

Zur Identifizierung des Spaltungsprodukts wurde der Rest der Ansatzflüssigkeit im Vakuum zum dünnen Sirup eingedampft und in 10-fache Menge 90-proz. Äthanol gegossen. Das von gebildetem Niederschlag befreite Filtrat wurde eingedampft und der Rückstand in wenig Wasser gelöst. Dazu setzte man 0.5 ccm α-Methylphenylhydrazin und 7 ccm 96-proz. Äthanol zu und liess bei Zimmertemperatur stehen. Selbst nach 7-tägigem Aufbewahren wurde kein Hydrazon erzeugt, was mit Wahrscheinlichkeit darauf hindeutet, dass die monomere Galaktose durch enzymatische Spaltung der Kohlenhydratkomponente nicht produziert wurde.

c) Die festen Membranbestandteile

Der nach Ausziehen mit heissem Wasser zurückbleibende Anteil der Zellmembran besteht aus der oberflächlichen Zellhaut (Fig. 3, A) und der Membran, die unmittelbar Protoplast umschliesst (Fig. 3, C).

Es wurde versucht, durch Einwirkung von Alkali bzw. Schwefelsäure unter verschiedenen Versuchsbedingungen, A und C-Membran getrennt zu untersuchen, was sich jedoch nicht zu den befriedigenden Resultaten geführt hatte. Beide Zellmembranen verhalten sich gegenüber diesen Angriffen fast gleichartig, indem aber A-Membran etwas beständiger ist als C-Membran. (Vgl. Versuche über *Porphyra umbilicalis*, S. 110). Daher wurde versucht, den Rückstand des Wasserauszugs als ganzes zu hydrolysieren und dadurch entstehende Bauelemente von A- und C-Membran zu identifizieren.

TABELLE XX
Analyse des Rückstandes von Wasserauszug
(Die Zahlen bedeuten % an Trockensubstanz)

Asche	2.12
Gesamt-N	12.2
Pentosan	2.81
Methylpentosan	1.59
Uronsäureanhydrid	1.43
Organisches SO_4	0.24

30 g getrockneter Substanz wurden mit 90 ccm 75-proz. Schwefelsäure versetzt, gut durchgemischt und bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach 4 Tagen wurde das dunkelbraune Reaktionsprodukt auf 2200 ccm verdünnt und 5-stundenlang auf dem siedenden Wasserbade erhitzt. Das Hydrolysat wurde mit Barytwasser und Bariumcarbonat neutralisiert, mit Tierkohle erwärmt und filtriert. Der Rückstand wurde zweimal mit heissem Wasser ausgezogen und das vereinigte Filtrat unter vermindertem Druck zum dünnen Sirup eingedampft, der unter heftigem Umrühren in 1000 ccm 96-proz. Äthanol hineingegossen wurde. Nach dem Stehen übernacht wurde der Niederschlag filtriert und das Filtrat mit Tierkohle entfärbt. Es wurde dann fast zur Trockne verdampft und der Rückstand in Wasser gelöst.

Die Lösung war schwach linksdrehend und zeigte folgende Reaktionen:

SELIWANOFFsche und PINOFFsche Reaktion nach Ketose +
Phloroglucinreaktion nach Pentose +
BIALsche Orcinreaktion nach Methylpentose +

Zu einer Portion dieser Lösung setzte man Phenylhydrazin und Essigsäure zu, wobei nach kurzem Stehen eine reichliche Menge von gelblichen Hydrazonkrystallen sich ausschied. Nach 5-stündigem Stehen wurden die Krystalle filtriert, mit Wasser und Alkohol nachgewaschen und aus 60-proz. Alkohol zu farblosen, rhombischen Krystallen vom Schmelzpunkt 195–6° umkrystallisiert. Mischschmelzpunkt mit dem Mannosephenylhydrazon vom Schmelzpunkt 196° wies keine Depression auf.

Das Filtrat aus dem Mannosephenylhydrazon wurde auf dem Wasserbade erhitzt, wobei sich gelbe Krystalle ausschieden, die heiss filtriert, mit heissem Wasser, dann mit kaltem Aceton nachgewaschen und getrocknet wurden. Sie stellten gelbe Nadeln dar und schmolzen bei 205–6°. Also liegt es Glucosephenylosazon vor, was zusammen mit dem positiven Ausfall der Ketosereaktionen sowie mit der Linksdrehung der Lösung mit Wahrscheinlichkeit darauf hindeutet, dass sich die Fructose im Hydrolysat befindet.

Aus dem Filtrat der Glucosazonkrystalle wurden beim Erkalten wiederum Osazonkrystalle erhalten, die filtriert, mit Wasser gewaschen und aus heissem Wasser umkrystallisiert wurden. Die noch braun gefärbten Krystalle wurden nach dem Trocknen im Exsikkator mit Äther ausgewaschen und noch einmal aus Wasser umkrystallisiert, wobei sich feine Nädelchen vom Schmelzpunkt 165–168° ergaben. In jeder Hinsicht ähneln sie Arabinosephenylosazon.

Eine andere Portion der Lösung wurde üblicherweise mit Salpetersäure oxydiert, wobei eine äusserst geringe Menge von Schleimsäure mit dem Schmelzpunkt 217° erzeugt wurde.

Zum Nachweis der Pentose und Methylpentose, deren Vorhandensein aus der positiven Phloroglucin- und Orcinreaktion sowie der ROSENTHALERschen Probe wahrscheinlich erscheint, wurde zunächst die Mannose, welche den Hauptteil der erhaltenen Zuckerlösung ausmacht, mittels Phenylhydrazins beseitigt. Zu der von Überschuss des Phenylhydrazins befreiten Zuckerlösung wurden dann *p*-Bromphenylhydrazin und Essigsäure zugesetzt und übernacht stehen gelassen, wobei eine geringe Menge von schwach bräunlichen Krystallen sich ausschied. Aus 90-proz. Alkohol umkrystallisiert, stellte das Produkt schwach gelbliche Nädelchen vom Schmelzpunkt 166° dar. Durch weiteres Umkrystallisieren aus 60-proz. Alkohol änderte sich der Schmelzpunkt nicht. Es zeigte

positive Farbenreaktionen von Pentose und Methylpentose, was zusammen mit der Tatsache, dass *l*-Arabinose und *l*-Fucose durch *p*-Bromphenylhydrazin leicht niedergeschlagen werden, mit Wahrscheinlichkeit darauf hinweist, dass das erhaltene *p*-Bromphenylhydrazon eine Mischung der Derivate von *l*-Arabinose und *l*-Fukose sei.*

d) Zur Frage nach Existenz der Cellulose

Wie oben erwähnt, konnte H. KYLIN bei *Porphyra laciniata* das Vorkommen der Cellulose durch Färbungsreaktionen nicht wahrnehmen. Zur Entscheidung der Frage, ob echte Cellulosemembran auch bei *Porphyra tenera* fehlt, wurde die „Rohfaser" dargestellt und den makro- und mikrochemischen Untersuchungen unterworfen.

200 g der lufttrockenen Alge wurden nacheinander mit Wasser, 1.25-proz. Natronlauge und 1.25-proz. Salzsäure je 3 Stunden auf dem Wasserbad erhitzt und der Rückstand mit verdünnter Natriumhypochloritlösung gebleicht, wodurch 9.6 g der grauweissen Substanz erhalten wurden.

Mikroskopische Untersuchungen haben gezeigt, dass Interzellularsubstanz vollständig und auch C-Membran nahezu zerstört wurde, während A-Membran grossenteils zurückblieb, obschon sie zu winzigen Stückchen zertrümmert wurde. Färbungsreaktionen mit Chlorzinkjod sowie mit Jod und Schwefelsäure fielen ganz negativ aus. Die „Rohfaser" ist löslich in Kupferammin, was jedoch an sich ohne weiteres nicht als der eindeutige Beweis für Cellulose betrachtet werden darf. Durch Acetolyse wurde keine Octacetylcellobiose erzeugt.

Hydrolyse: Zu 7.2 g dieser Substanz wurden 22 cm 75-proz. Schwefelsäure zugesetzt und bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach 5 Tagen wurde das dunkelbraune Reaktionsgemisch auf 550 ccm verdünnt und 5-stundenlang auf dem siedenden Wasserbad erhitzt. Man neutralisierte das Hydrolysat mit Bariumcarbonat und engte das mit Tierkohle entfärbte Filtrat zum dicken Sirup ein, der mit heissem 96-proz. Alkohol ausgezogen wurde. Das alkoholische Extrakt wurde fast zur Trockene verdampft und der Rückstand in Wasser gelöst. Die folgenden qualitativen Reaktionen, die mit dieser Lösung geprüft wurden, fielen negativ aus: SELIWANOFFsche und PINOFFsche Reaktion nach Ketose; Phloroglucin- und Orcinreaktion nach Pentose; ROSENTHALERsche Reaktion nach Methylpentose; Schleimsäurereaktion nach Galaktose.

Zu einer Portion des Hydrolysats wurden Phenylhydrazin und Essigsäure zugesetzt, wobei sofort eine beträchtliche Menge von Hydrazonkrystallen sich ausschied. Nach Aufbewahren übernacht im Eisschrank

---

* Als Schmelzpunkt des *l*-Arabinose-*p*-Bromphenylhydrazons ist 168° und als der des *l*-Fukose-*p*-Bromphenylhydrazons 178° angegeben.

wurde das Produkt filtriert, mehrmals mit Wasser, dann mit 96-proz. Alkohol gewaschen und aus 60-proz. Alkohol zu den farblosen, rhombischen Tafeln vom Schmelzpunkt 197° umkrystallisiert. Also stellt das Produkt Mannosephenylhydrazon dar. Das Filtrat samt mit Waschwasser schied beim Aufbewahren übernacht im Eisschrank wiederum eine geringe Menge von Mannosephenylhydrazon aus. Es wurde filtriert und das Filtrat in zwei Portionen geteilt.

Die eine wurde 40 Minuten auf dem siedenden Wasserbad erhitzt, wobei sich eine grosse Menge gelber Osazonkrystalle ausschied. Das Produkt wurde filtriert, mit Wasser und kaltem Aceton nachgewaschen und aus 60-proz. Alkohol umkrystallisiert, wobei gelbe Nadeln vom Schmelzpunkt 199° erhalten wurden. Durch weiteres Umlösen aus 60-proz. Alkohol stieg der Schmelzpunkt auf 201°. Bei der Mischprobe mit dem Glucosephenylosazon vom Schmp. 205° ergab einen Mischschmelzpunkt von 202°. Aus dem negativen Ausfall der beiden Ketosereaktionen halte ich es für wahrscheinlich, dass das erhaltene Glucosazon aus Glucose stammt.

Zu der anderen Portion des Hydrazonfiltrats, nachdem man daraus das zurückbleibende Phenylhydrazin mittels Benzaldehyds entfernt hatte, wurden *p*-Bromphenylhydrazin und Essigsäure zugesetzt und bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach 3-tägigem Stehen wurde kein Hydrazon erzeugt. Beim Erwärmen auf dem Wasserbad wurden gelbe Osazonkrystalle erhalten, die nach Waschen mit Wasser und Alkohol aus 90-proz. Äthanol zu den gelben Nädelchen vom Schmelzpunkt 214° umkrystallisiert wurden. Allem Anschein nach ist das Produkt mit dem Glucose-*p*-Bromphenylosazon (Schmp. 215–16°) identisch.

Aus diesen Resultaten kann mit Wahrscheinlichkeit gesagt werden, dass sich am Aufbau der „Rohfaser“, die den Hauptbestandteil von A-Membran darstellt, Mannose und eine geringe Menge von Glucose beteiligen. Obschon die Glucose als Bestandteil nachgewiesen wurde, so scheint doch das Vorkommen der Cellulose zweifelhaft, weil die Färbungsreaktionen mit Jodregenzien und der Acetolyseversuch sich zu den negativen Resultaten geführt haben.

e) Mikrochemische Versuche

Wie eingangs erwähnt, besteht die Zellmembran von *Porphyra tenera* aus drei Teilen, A, B, und C, wie in Fig. 3 schematisch dargestellt.

An der Mikrotomschnitte wurden folgende Versuche angestellt.

1) Mit Hämatoxylin färben sich A- und C-Membran stark dunkelviolett, während B-Haut farblos bleibt.

2) Mit Chlorzinkjod färfbt sich das Protoplast dunkelbraun, dagegen werden A- und C-Membran nur schwach gelb und B-Wand gar nicht gefärbt.

3) Mit Jod und 60-proz. Schwefelsäure quillt das Gewebe sehr stark, wobei B-Haut fast augenblicklich und C-Membran etwas langsamer zerstört werden, während A-Wand nur schwer angegriffen wird. Diese Verhältnisse kann man noch deutlicher an dem Thallus von *Porphyra umbilicalis* f. *linealis* beobachten, dessen A-Membran dicker ist als die von *P. tenera*. Also erweist sich A-Haut gegen Schwefelsäure als viel beständiger als C-Haut.

4) Sudan III färbt keine der drei Zellwände rot.

5) Unter gekreuztem Nicol ist keine Anisotropie wahrzunehmen.

6) Durch Einwirkung heisser 5-proz. Kalilauge werden B-Haut sofort und C-Wand allmählich zerstört, während A-Membran ungelöst bleibt. Also wird die ungleiche Widerstandsfähigkeit zwischen A- und C-Haut wiederum festgestellt.

Daraus ergibt sich, dass die Oberflächenzellhaut (A) unter den drei Membranbestandteilen am resistentesten ist, wobei jedoch die Cellulosenatur derselben durch Färbungsreaktionen mit Jodreagenzien sowie durch optische Anisotropie zu verneinen ist. Die Beobachtung, dass A-Haut sich mit Sudan III nicht färbt, kann man zusammen mit der Benetzbarkeit des Thallus mit Wasser als Beweis dafür betrachten, dass A-Haut nicht kutikula-artig ist. Auch C-Haut besteht nicht aus Cellulose, was aus dem Verhalten gegenüber 5-proz. Kalilauge und aus Färbungsreaktionen mit Jodreagenzien geschlossen wird.

f) Besprechung

Die Zellhaut von *Porphyra tenera* setzt sich aus drei Teilen zusammen, die sich sowohl morphologisch als auch chemisch voneinander mehr oder weniger scharf unterscheiden lassen.

Die Zellmembran (B) ist die, welche, in Form einer Interzellularsubstanz zwischen der oberflächlichen (A) und der innersten Membran (C) vorkommt. Sie lässt sich mit heissem Wasser extrahieren und dadurch von den anderen Membranbestandteilen leicht trennen. Ihre Lösung ist nicht so schleimig wie die der Interzellularsubstanz von meisten Florideen.

Chemisch stellt sie einen komplexen, sauren Polysaccharidschwefelsäureester dar, welcher *d,l*- und *d*-Galaktose als sie wichtigsten Kohlenhydratkomponenten enthält. Die razemische Galaktose, die etwa 90% der gesamten Kohlenhydratkomponenten ausmacht, ist eine charakteristische Substanz für *Porphyra*-Arten.

Die Interzellularsubstanz wird durch verdünnte Mineralsäuren leicht angegriffen, während sie biologisch weitgehend resistent ist, indem die Enzyme von Pankreas der höheren Tiere, Malzextrakt, Takadiastase, *Bacillus coli* und *Bacillus fluorescens liquefaciens* darauf völlig unwirksam sind. Unter den geprüften Fermenten sind diejenigen von Hepatopankreas der herbivoren Mollusken, *Haliotis gigantea* und *Aplysia punctata*, imstande, diese Substanz sowohl carbohydratatisch als auch sulfatatisch zu zerlegen.

Die Zellmembran (A) bildet die äusserste Zellhaut des Thallus, die sowohl physikalisch als auch chemisch ziemlich feste Substanz ist, was zu ihrer Schutzfunktion geeignet erscheint. Manchmal ist dies bisher ohne Rücksicht auf die chemische Natur als eine kutikula-artige Zellhaut angesehen worden. Unsere chemische Untersuchungen haben ergeben, dass dies nicht zutrifft. Mit dem Fettfarbstoff, wie Sudan III, färbt sich diese Zellwand nicht. Sie ist im wesentlichen ein Polysaccharid, als dessen Baustein eine grosse Menge von Mannose neben einer geringen Menge von Glucose nachgewiesen wurde.

Die Zellhaut (C) ist die, welche unmittelbar das Protoplast umgibt. Obschon diese etwas weniger resistent ist als A-Membran, so ist doch die vollständige Trennung von der A-Membran etwas schwer durchzuführen. Daher kann man über den Baustein der C-Haut nichts sicheres aussagen. Vorläufig halte ich es vielmehr für wahrscheinlich, dass sich Mannose, Fructose, Glucose, Arabinose und Fukose (?) an deren Aufbau beteiligen.

Wie oben erwähnt, haben K. Oshima und B. Tollens die Mannose ausser der inaktiven Galaktose aus dem Hydrolysat der Gesamtalge isoliert. In Anbetracht der eigenen Versuchsresultaten erscheint es sehr wahrscheinlich, dass unter den Versuchsbedingungen der genannten Autoren, auch A- und C-Membran, wenigstens zum Teil, angegriffen wurden.

Das Vorkommen der echten Cellulose ist zweifelhaft. Dafür sprechen die Befunde: keine Octacetylcellobiosebildung bei der Acetolyse; negative Färbungsreaktionen mit den Jodreagenzien, selbst nach Behandlung der Zellhaut mit verdünnten Säuren und Laugen; optische Anisotropie.

Von botanisch-systematischem Standpunkt aus betrachtet, erscheinen die folgenden Punkte beachtenswert.

Als einer der Rotalgen hat *Porphyra tenera* auch bezüglich der Zellmembran einige gemeinsame Eigenschaften mit den Florideen. Nämlich kommt in den beiden Algengruppen eine Interzellularsubstanz vor, die als Hauptkomponente Galaktose enthält. Auch an dieser Substanz ist Schwefelsäure in Form sauren Esters gebunden. Da man bisher bei den Grün- und Braunalgen diejenige Interzellularsubstanz nicht angetroffen hat, die aus sehr grosser Menge von Galaktose aufgebaut ist, so kann man diese Eigenschaft als charakteristisch für Rhodophyceen betrachten.

Hingegen besteht aber auch ein grosser Unterschied zwischen Bangiales und Florideae in bezug auf die morphologischen Eigenschaften und den Fortpflanzungsmodus. Dementsprechend bemerkt man auch hinsichtlich der Zellmembranbestandteile wohl eine ausgeprägte Differenz. In der Zellmembran der meisten Florideen kommt echte Cellulose vor, während man sie bei den Bangiaceen vermisst. Die feste Zellhaut der letzteren besteht zum grossen Teil aus dem Polysaccharid, dessen Hauptbestandteil *d*-Mannose ist.

Was die Interzellularsubstanz anbetrifft, so liegt hier auch ein erheblicher Unterschied vor, indem die der Florideen *d*-Galaktose und die der Bangiaceen *d,l*-Galaktose als wesentliche Kohlenhydratkomponente enthalten.

3. Einige Versuche über die Zellmembran von *Porphyra umbilicalis* f. *linealis*

Diese Alge wächst im Meer von Nordost-Japan (Hokkaidô, Kurilen, Sachalien) und kann dort als Handelsprodukt bezogen werden. Vorliegende Versuchsmaterialien wurden durch Freundlichkeit von Herrn JIRO NIINO mir zur Verfügung gestellt, wofür ich herzens danke.

TABELLE XXI

Analyse der Gesamtalge
(Die Zahlen bedeuten % an Trockensubstanz)

Asche	7.13 (SO_4 1.75)
Gesamt-N	4.89
Rohfaser	17.7
Organisches SO_4	4.41

Die Alge ist viel derber als *Porphyra tenera*, was hauptsächlich auf die verhältnismässig dicke Oberflächenzellhaut beruht. Wie aus der folgenden Tabelle ersichtlich, dürfte auch der hohe Gehalt an Rohfaser diesen Umstand anzeigen.

Interzellularsubstanz

Zum Extrahieren der Interzellularsubstanz wurden 67 g der lufttrockenen Alge (Wassergehalt 17.4%) zweimal je mit 3 l destilliertem Wasser 2.5 Stdn. bei 127–130° autoklaviert. Die vereinigten Auszüge wurden durch Watte filtriert und im Vakuum etwa zu einem halben Volumen eingedampft.

Ohne die gesuchte Substanz zu isolieren, wurde der Auszug sofort hydrolysiert. Dazu wurde die Lösung mit Schwefelsäure zu 2% versetzt und im Autoklav 3-stundenlang bei 124–127° erhitzt. Aus dem gereinigten Hydrolysat wurde eine Zuckerlösung (120 ccm) erhalten, mit der folgende Versuche angestellt wurden.

Qualitative Reaktionen:

SELIWANOFFsche Reaktion nach Ketose	+?
PINOFFsche Reaktion nach Ketose	—
Phloroglucin- und Orcinreaktion nach Pentose	—
ROSENTHALERsche Reaktion nach Methylpentose	—

Drehung:

$$[\alpha]_D^{21} = \frac{+0.71^\circ \times 100}{5.25 \times 1} = 13.5^\circ .$$

Die Zuckerkonzentration wurde nach BERTRAND bestimmt und als Galaktose ausgedrückt.

Nachweis der Zuckerarten:

Zu 15 ccm der Lösung wurden 1 ccm Phenylhydrazin und 1.2 ccm Eisessig zugesetzt und bei Zimmertemperatur stehen. Nach 5 Stunden wurde kein schwerlösliches Hydrazon erzeugt. Die Flüssigkeit wurde dann 40-minutenlang auf dem siedenden Wasserbad erhitzt, wobei eine beträchtliche Menge gelber Osazonkrystalle erzeugt, die heiss filtriert, mit kaltem Aceton gründlich gewaschen und aus 60-proz. Äthanol zu den gelben Nadeln vom Schmelzpunkt 206–207° umkrystallisiert wurden. Also stellt das Produkt das Glucosephenylosazon dar. Auf Grund der Abwesenheit der Mannose (kein schwerlösliches Hydrazon) und der negativen Ketosereaktion sowie auch der Rechtsdrehung, worüber unten noch erörtert wird, kann man mit Wahrscheinlichkeit vermuten, dass das erhaltene Glucosazon von Glucose stammt.

Das Filtrat aus den Osazonkrystallen samt mit der Aceton-Waschflüssigkeit wurde im Vakuum eingeengt und die dabei gebildeten Krystalle dreimal aus 60-proz. Äthanol umkrystallisiert. Die so gewonnenen gelben Nadeln schmolzen bei 188–189°. Sie dürften mit dem Galaktosephenylosazon identisch sein.

60 ccm der Zuckerlösung wurden mit 4 ccm α-Methylphenylhydrazin in 30 ccm 60-proz. Äthanol und 3 ccm Eisessig versetzt, wobei sich fast sofort eine erhebliche Menge von Hydrazonkrystallen ausschied. Nach Stehen übernacht wurden sie filtriert, stark abgesaugt und zweimal aus 70-proz. Äthanol umkrystallisiert, wobei reinweisse Schuppen vom Schmelzpunkt 186–187° erhalten wurden. In jeder Hinsicht sind sie identisch mit dem Galaktose-α-methylphenylhydrazon.

Da man hierbei mit Wahrscheinlichkeit erwarten kann, dass das Produkt, analog dem Fall von *Porphyra tenera*, auch ein Gemisch von α-Methylphenylhydrazon der *d,l*- und *d*-Galaktose darstellt, so wurde versucht, das Mengenverhältnis der beiden Galaktosen festzustellen.

Dazu wurden 2 g Hydrazon mittels des Benzaldehydverfahrens in freien Zucker übergeführt. Es wurden hierbei 25 ccm der gereinigten Zuckerlösung erhalten, mit der der Zuckergehalt (als Galaktose) und das Drehungsvermögen ermittelt wurden.

$$[\alpha]_D^{18} = \frac{+0.20^\circ \times 100}{4.16 \times 1} = +4.8^\circ .$$

In analoger Weise wie bei *Porphyra tenera,* berechnet sich das Verhältnis,

$$d,l\text{-Galaktose} : d\text{-Galaktose} = 100 : 6.36.$$

Also ist der Gehalt an *d*-Galaktose bei *Porphyra umbilicalis* etwas geringer als bei *P. tenera.*

Vergleicht man das Drehungsvermögen des Hydrolysats von Interzellularsubstanz (+13.5°) mit dem der daraus gewonnenen Galaktosemischung (+ 4.8°), so kann man wohl mit Sicherheit sagen, dass im Hydrolysat noch andere rechtsdrehende Zuckerarten als *d*-Galaktose vorhanden sein müssen. Dies zusammen mit dem eben erwähnten Befund, dass das Glucosazon aus dem Hydrolysat erhalten wurde, kann auch als Beweis dafür betrachtet werden, dass die Interzellularsubstanz *d*-Glucose als Komponente enthält.

Rückstand des Wasserauszugs

Beobachtet man unter Mikroskop den Rückstand, welcher nach Ausziehen des Thallus mit heissem Wasser zurückbleibt, so ersieht man klar, dass beide feste Zellmembranen, A und C, beinahe intakt bleibt. (Fig. 4.) Durch geeignete Einwirkung der Schwefelsäure ist es mir geglückt, die Bausteine von A- und C-Membran annähernd getrennt zu untersuchen.

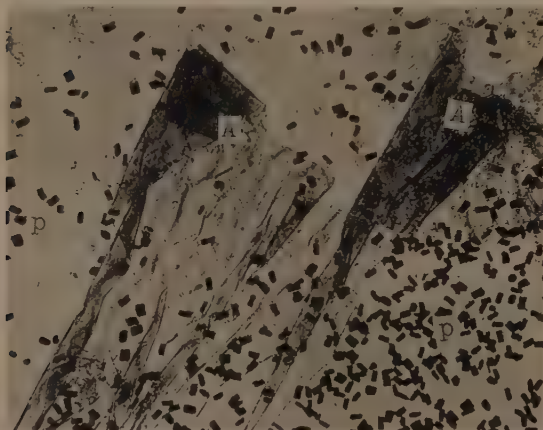


Fig. 4. *Porphyra umbilicalis* f. *linealis.* Thallusstück nach Ausziehen mit Wasser. Mit Jod und 60-proz. Schwefelsäure behandelt. A: A-Membran. p: Protoplast. (×80)

Dazu wurde der Rückstand in 2 l Wasser suspendiert, mit konz. Schwefelsäure zu 3-proz. versetzt und 3 Stdn. bei 125–127° autoklaviert. Aus dem Hydrolysat wurden 25 ccm gereinigte Zuckerlösung gewonnen, die folgende Reaktionen aufzeigten.

SELIWANOFFsche Reaktion nach Ketose	+
Phloroglucinreaktion nach Pentose	—
ROSENTHALERsche Reaktion nach Methylpentose	+

Drehung:

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{-2.62^\circ \times 100}{6.72 \times 1} = -39.0^\circ .$$

Der Zuckergehalt der Lösung wurde an dem Aliquot bestimmt und als Mannose ausgedrückt.

Nachweis der Zuckerarten:

10 ccm Zuckerlösung wurden mit 1 ccm Phenylhydrazin, 1.5 ccm Eisessig und 5 ccm Wasser versetzt und bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Bald schied sich eine beträchtliche Menge der Hydrazonkrystalle aus, die nach dem 3.5 Stdn. Stehen filtriert, mit Wasser und 96-proz. Alkohol gewaschen und aus 60-proz. Alkohol unter Anwendung von Tierkohle zu farblosen, rhombischen Tafeln vom Schmelzpunkt 198–199° umkrystallisiert wurden. Mithin stellt das Produkt Mannosephenylhydrazon dar.

Das Filtrat lieferte bei 4-tägigem Aufbewahren im Eisschrank eine geringe Menge feiner, gelber Nadeln, die nach Umlösen aus 60-proz. Äthanol als Glucosephenylosazon vom Schmelzpunkt 203–5° erkannt wurden.

Das Filtrat aus den Osazonkrystallen wurde in zwei Portionen geteilt. Die eine wurde auf dem Wasserbad erhitzt, wobei gelbe Osazonkrystalle sich ausschieden. Sie wurden heiss filtriert, mit Wasser und kaltem Aceton gewaschen und aus 60-proz. Äthanol umkrystallisiert, wobei das Glucosephenylosazon vom Schmelzpunkt 206° erhalten wurde. Das Filtrat lieferte nach dem Erkalten wiederum gelbe Nadeln, die abgesaugt, mit Wasser gewaschen und aus 50-proz. Äthanol umkrystallisiert wurden. Sie stellen feine Nädelchen dar und schmolzen bei 186–187°. Obschon der Schmelzpunkt mit dem des Galaktosephenylosazons übereinstimmt, so sei doch das erhaltene Phenylosazon damit nicht identisch, weil das Filtrat aus dem Mannosephenylhydrazon, wie es gleich unten gezeigt wird, frei von Galaktose zu sein scheint.

Die andere Portion wurde mit α-Methylphenylhydrazin und Alkohol versetzt und bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Selbst nach 24 Stunden wurde kein Hydrazon erzeugt. Da das α-Methylphenylhydrazin ein sehr empfindliches Reagens für Galaktose ist, so liegt es nahe anzunehmen, dass die Galaktose darin nicht vorhanden sei.

Zu der anderen Portion der Zuckerlösung wurden p-Bromphenylhydrazin und Essigsäure zugesetzt, wobei sich fast sofort farblose Krystalle ausschieden. Nach 2.5-stdg. Stehen wurde das Produkt filtriert

und aus 75-proz. Äthanol zu den etwas breiten Nadeln vom Schmelzpunkt 210° umkrystallisiert. Es ist also identisch mit dem Mannose-*p*-Bromphenylhydrazon (Schmp. 209°).

Daraus erscheint, dass das Vorhandensein der Mannose in diesem Hydrolysat sicher ist, dagegen das der Galaktose zweifelhaft bleibt. Aus der positiven Ketosereaktion und der Bildung von Glucosazon sowie auch aus der Linksdrehung der Lösung kann man mit Wahrscheinlichkeit vermuten, dass die Fructose auch darin vorhanden ist. Ferner deutet die positive ROSENTHALERsche Reaktion darauf hin, dass die Methylpentose darin enthalten ist.

Beim Mikroskopieren des Rückstandes, der nach Behandlung mit Schwefelsäure ungelöst blieb, ersieht man, dass die innerste Zellmembran (C) nahezu zerstört wird, während die äusserste Zellwand (A) zum grossen Teil zurückbleibt, obwohl sie auch zu kleinen Stückchen zertrümmert wird. Daraus erscheint die Annahme auch naheliegend, dass die nachgewiesenen Zuckerarten hauptsächlich die Bestandteile der C-Membran bilden.

Zur Feststellung der chemischen Natur des Bausteins von C-Membran wurde der Rückstand, welcher bei der obigen Operation ungelöst blieb, mit 12 ccm konz. Schwefelsäure versetzt und 3.5-stundenlang im Autoklav bei 127–130° erhitzt. Durch diese Behandlung wird die Zellmembran, die hierbei grossenteils aus der festesten Zellwand A besteht, nahezu abgebaut, was aus der mikroskopischen Untersuchung des Produkts leicht zu erkennen ist. Das Hydrolysat wurde üblicherweise zur gereinigten Zuckerlösung (40 ccm) verarbeitet und den folgenden Untersuchungen unterworfen.

Qualitative Reaktionen:

SELIWANOFFsche Reaktion nach Ketose	+
Phloroglucinreaktion nach Pentose	+?
ROSENTHALERsche Reaktion nach Methylpentose	−

Drehung:

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{-0.14^\circ \times 100}{3.08 \times 1} = -4.5^\circ .$$

Die Zuckerkonzentration wurde an dem Aliquot ermittelt und als Mannose ausgedrückt.

Nachweis der Zuckerarten:

Zu 25 ccm Lösung wurden 1 ccm Phenylhydrazin und 1.5 ccm Eisessig zugesetzt und bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Fast sofort schied sich eine beträchtliche Menge der Hydrazonkrystalle aus, die nach 12.5-stündigem Stehen filtriert und aus 60-proz. Äthanol umkrystallisiert

wurden. Das Produkt zeigte den Schmelzpunkt von 197°, übereinstimmend mit dem des Mannosephenylhydrazons. Das Filtrat wurde nun auf dem siedenden Wasserbad erwärmt, wobei eine geringe Menge gelber Nadeln gebildet wurde, die heiss filtriert, mit Wasser und kaltem Aceton nachgewaschen und aus 60-proz. Alkohol umkrystallisiert wurden. Durch Schmelzpunkt (205°) und Krystallform liess sich das Produkt mit dem Glucosazon leicht identifizieren. Aus der positiven Ketosereaktion und der Linksdrehung der Lösung ist zu vermuten, dass die Fructose, wenigstens zum Teil, für die Bildung von Glucosazon verantwortlich ist.

Aus den geschilderten Versuchen ist zu ersehen, dass die chemische Natur der Zellmembran von dieser Alge und *Porphyra tenera* im wesentlichen gleich ist. Die Interzellularsubstanz setzt sich zum grossen Teil aus *d,l*-Galaktose und zum geringen aus *d*-Galaktose und *d*-Glucose zusammen. Wie bei *Porphyra tenera,* scheint auch die organisch gebundene Schwefelsäure den Bestandteil der Interzellularsubstanz darzustellen.

Die festeren Anteile der Zellwand, A- und C-Membran, sind auch gleichartig aufgebaut wie bei *Porphyra tenera,* indem *d*-Mannose die Hauptkomponente ausmacht. Durch fraktionierte Zerlegen der beiden Zellhäuten konnte wahrscheinlich gemacht werden, dass sich eine nicht geringe Menge von Fructose am Aufbau der C-Membran beteiligt.

4. Zellmembran von *Gigartina tenella*

(Experimentell mitgearbeitet von S. HORI)

a) Allgemeines

Als Bestandteil der Zellmembran von Florideen sind bisher Cellulose und Pektinstoffe bekannt geworden. Obwohl die morphologischen Gewebestrukturen je nach der systematischen Stellung der Alge verschieden sind, so scheinen doch diese beiden Substanzen als allgemeine Membranstoffe von Florideen anzusehen.

Die Cellulose in den Florideen sind meist mikrochemisch und zwar durch Färbungs- und Lösungsreaktionen unter Mikroskop nachgewiesen worden. So hat H. KYLIN(1) mit Hilfe der Jodreagenzien angezeigt, dass diejenige Zellmembran der meisten Rotalgen, die an Plasma anliegt, aus Cellulose besteht. H. WALTER(2) beobachtete, dass bei *Chondrus crispus* und *Rhodochorton floridulum* eine Zellhaut vorkommt, die sich zwar mit Chlorzinkjod blau färbt, aber unlöslich in Kupferoxydammoniak ist. Hingegen wurde von B. RUSSELL-WELLS(3) gezeigt, dass die aus *Chondrus crispus* isolierte Fasersubstanz in Kupferamminlösung löslich ist.

(1) Z. physiol. Chem., **94**, 337 (1915).
(2) Jahrb. wiss. Bot., **62**, 204 (1923).
(3) Biochem. J., **14**, 578 (1923).

Neuerdings versuchten G. N. NAYLOR und B. RUSSELL-WELLS,[1] das Vorkommen der Cellulose mit noch zuverlässigeren Methoden festzustellen. Diese Autoren stellten die Rohfaser aus verschiedenen Florideen durch Behandlung der Alge mit verdünnter Schwefelsäure und Natronlauge her und damit folgende Prüfungen durchgeführt: 1. Löslichkeit in Kupferoxydammoniak; 2. Blaufärbung mit Jod und Schwefelsäure; 3. Löslichkeit des Acetylderivats in Chloroform. Fallen diese drei Proben alle positiv aus, dann wird das Vorkommen der echten Cellulose von diesen Autoren als sichergestellt betrachtet.

Diese Verfahren zum Cellulosenachweis können jedoch nicht immer eindeutig sein, da es andererseits bekannt ist, dass die mit Jod sich blau färbende Substanz, das sogenannte „Amyloid", auch bei einigen Rotalgen vorkommt.[2] Daher erscheint es uns wünschenswert, die Cellulose der Rotalgen noch näher zu untersuchen.

In den meisten Florideen ist eine beträchtliche Menge schleimiger Substanz enthalten, die sich mit heissem Wasser leicht extrahieren lässt. Auf dem Grunde, dass dieser Schleimstoff die Färbungsreaktionen von Pektin, wie z. B. Rotfärbung mit Rutheniumrot, aufzeigt und dass sie Substanz von Säurenatur ist, ist dieser Schleim als ein Pektinstoff angesehen worden. Als wichtige Handelsprodukte dieses Schleimstoffs sind seit langem Agar und Carrageenschleim bekannt. Die Hauptkomponente des Agars wurde von M. PAYEN[3] als Gelose bezeichnet, die bei der Hydrolyse eine grosse Menge von Galaktose liefert. Carrageenschleim stammt vornehmlich von *Chondrus crispus*. Durch Oxydation mit Salpetersäure haben J. HÄDICKE, R. W. BAUER und B. TOLLENS[4] soviel Schleimsäure erhalten, dass sie etwa 20–28% Galaktose entspricht. Aus dem Hydrolysat desselben wurde auch Fructose nachgewiesen. J. SEBOR[5] teilte mit, dass der Carrageenschleim bei der Hydrolyse eine erhebliche Menge von Galaktose neben Glucose und Fructose liefert. Von P. HAAS und B. RUSSELL-WELLS[6] wurde die Bildung von Galaktose und einer geringen Menge von Glucose, Fructose, und Pentose als Hydrolysenprodukt beobachtet.

---

(1) Ann. Bot., **48**, 635 (1934).
(2) A. HENCKEL in Nyt. Mag. Naturvidenskab., **39**, 355 (1901); R. KOLKWITZ in Wiss. Meeresunters., N.F. **4** (1900), zitiert nach H. KYLIN, Z. physiol. Chem., **94**, 337 (1915); C. SAUVAGEAU in Bull. Stat. Arcachon, **18**, 113 (1921).
(3) Compt. rend. Acad. Sci., **49**, 521 (1859).
(4) Ann. Chem., **238**, 302 (1887).
(5) Österr. Chem. Ztg., **3**, 441 (1900); Bot. Zentralbl., **86**, 70 (1901).
(6) Biochem. J., **23**, 425 (1929).

Die Schleimstoffe von *Ceramium rubrum* und *Furcellaria fastigiata* wurden von H. KYLIN[1] untersucht, der zeigte, dass sie bei Oxydation mit Salpetersäure eine beträchtliche Menge von Schleimsäure erzeugen. Dabei wurde auch beobachtet, dass die betreffende Substanz eine positive Pentosereaktion gibt.

Von T. TADOKORO und Mitarbeitern[2] wurde der Schleimstoff von *Iridaea laminarioides* erforscht. Als Baustein dieser Substanz wurden *l*-Arabinose, *l*-Fukose sowie auch Erythrose neben einer grossen Menge von Galaktose nachgewiesen.

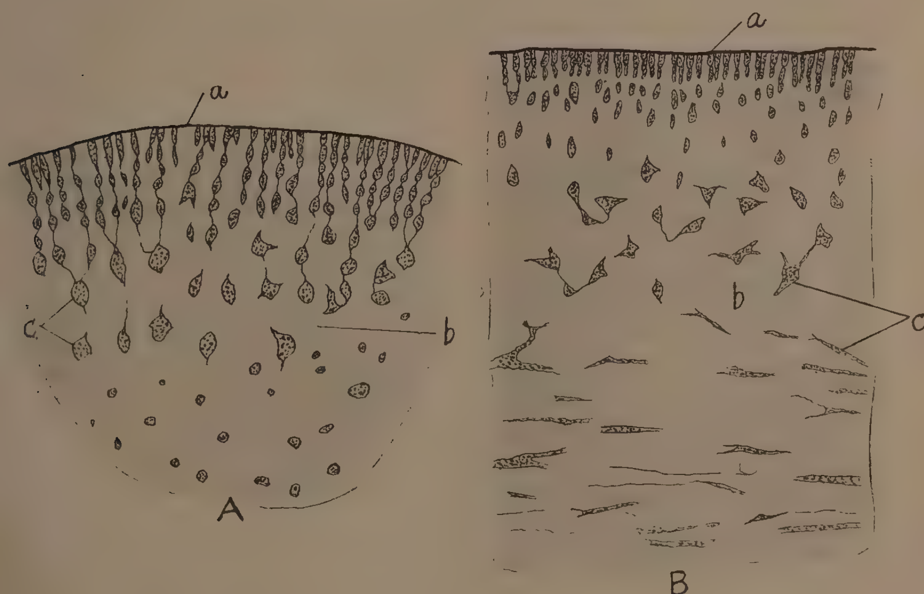


Fig. 5. *Gigartina tenella*. A: Querschnitt. B: Längsschnitt. *a*: Äusserste Zellhaut. *b*: Interzellularsubstanz. *c*: Innerste Zellhaut. (×40)

Kürzlich gab N. W. PIRIE[3] an, dass Heptacetyl-*d*,*l*-Galaktose bei der Acetolyse von Agar entsteht. Auch teilte C. ARAKI[4] mit, dass er *l*-Galaktose aus dem Hydrolysat von Agar nach Beseitigen der gärbaren Zucker mit Hefe isolierte.

(1) Z. physiol. Chem., **83**, 171 (1913).
(2) J. Chem. Soc. Japan, **55**, 617 (1934); **56**, 188 (1935).
(3) Biochem. J., **30**, 369 (1936).
(4) J. Chem. Soc. Japan, **58**, 958 (1937).

In Anbetracht meines oben erwähnten Befundes, dass der Hauptbaustein der Interzellularsubstanz von *Porphyra tenera* und *P. umbilicalis* f. *linealis* *d,l*-Galaktose ist, erscheint das Vorkommen der razemischen bzw. linksdrehenden Galaktose bei einigen Florideen sehr interessant.

In Agar und Carrageenschleim kommt die Schwefelsäure als ein integrierender Bestandteil vor, die in Form eines Kohlenhydratschwefelsäureesters vorliegt.(1)

Bei der vorliegenden Arbeit wurde versucht, erstens das Vorkommen der echten Cellulose in Florideen eindeutig nachzuweisen und die Lokalisation derselben in der Zellmembran mikrochemisch festzustellen und zweitens die chemische Natur der Interzellularsubstanz klarzulegen.

Das Versuchsmaterial, *Gigartina tenella*, ist eine Gigartinales angehörende Alge, die sehr reich an Schleimsubstanz ist. Wie aus Fig. 5 ersichtlich, ist der Thallus aus fadenförmigen Zellen und dazwischen liegender Interzellularsubstanz aufgebaut. Die äusserste, derbe Zellhaut, welche die Oberfläche des Thallus bildet, besteht nicht aus Cellulose.

Die Versuchsmaterialien wurden im Frühsommer in der Nähe von „Simoda Marine Biological Station" unserer Universität gesammelt und nach Waschen mit Süsswasser und Trocknen an der Luft ins hiesige Institut gebracht.

TABELLE XXII
Analyse der Gesamtalge
(Die Zahlen bedeuten % an Trockensubstanz)

Asche	20.8
Gesamt-N	3.91
Rohfaser	1.78
Pentosan	1.30
Methylpentosan	Spur
Uronsäureanhydrid	1.51
Organisches SO_4	25.4

Die Bestimmungsmethoden sind dieselben wie bei *Porphyra tenera*. Hierbei ist der sehr hohe Gehalt an organisch gebundener Schwefelsäure bemerkenswert.

b) Cellulose

Zur Darstellung der Rohfaserpräparate wurde die lufttrockene Alge zuerst mit heissem Wasser erschöpfend extrahiert und der Rückstand

(1) C. NEUBERG u. H. OHLE in Biochem. Z., **125**, 311 (1921); M. SAMEC u. V. ISAEWICZ in Compt. rend., **173**, 1472 (1921); Kolloidchem. Beih., **16**, 285 (1922); P. HAAS in Biochem. J., **15**, 464 (1921); W. F. HOFFMANN u. R. A. GORTNER in J. Biol. Chem., **65**, 371 (1925); F. FAIRBROTHER u. H. MASTIN in J. Chem. Soc., **123**, 1412 (1923); W. Z. HASSID in J. Am. Chem. Soc., **55**, 4163 (1933); E. TAKAHASHI u. K. SHIRAHAMA in J. Fac. Agr. Hokkaido Imp. Univ., **35**, 101 (1934).

ganz in derselben Weise wie bei den Braunalgen verarbeitet. Das so erhaltene Produkt vom Aschengehalt 0.67% stellte die Substanz dar, die sich mit Jod und Schwefelsäure blau und mit Chlorzinkjod blau-violett färbt. Es löst sich ziemlich leicht in Kupferamminlösung. Zur eindeutigen Feststellung der Cellulosenatur wurde das Produkt der Acetolyse unterworfen.

2 g Substanz wurden mit einem Gemisch von 12 ccm Essigsäureanhydrid, 2 ccm konz. Schwefelsäure und 5 ccm Eisessig durchknetet und bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach 8 Tagen schieden sich weisse Krystallen aus, die nach weiterem 7-tagelangem Aufbewahren in Eiswasser hineingegossen wurden. Der Niederschlag wurde, nach Stehen übernacht filtriert, mit Wasser gewaschen und zweimal aus 75-proz. Äthanol zu rein weissen Nadeln vom Schmelzpunkt 221° umkrystallisiert.

Drehung:

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{+0.98^\circ \times 100}{2.3729 \times 1} = +41.3^\circ \quad \text{(in Chloroform).}$$

Also stellte das Produkt reine α-Octacetylcellobiose dar, woraus mit Sicherheit gefolgert werden kann, dass echte Cellulose in der Zellhaut von *Gigartina tenella* vorkommt.

Weiter wurde versucht, festzustellen, ob die anderen Florideen von verschiedener systematischer Stellung ebenfalls echte Cellulose führen. Dazu wurden folgende Arten herangezogen.

Carpopeltis cornea (Cryptonemiales),
Gymnogongrus sp. (Gigartinales),
Lomentaria catenata (Rhodymeniales),
Gracilaria textorii (Ceramiales).

Aus jeder Alge wurde die Cellulose ganz in derselben Weise wie bei *Gigartina* isoliert und den folgenden Prüfungen unterworfen.

1. Färbbarkeit mit Chlorzinkjod sowie mit Jod und Schwefelsäure.
2. Löslichkeit in Kupferamminlösung.
3. Bildung der Octacetylcellobiose durch Acetolyse.

Die Resultate wurden in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

TABELLE XXIII

Alge	Blaufärbung mit Jod u. H_2SO_4	Violettfärbung mit Chlorzinkjod	Löslichkeit in Kupferammin	Octacetylcellobiose	
				Schmp.	$[\alpha]_D$ in $CHCl_3$
Carpopeltis cornea	+	+	+	220°	−38.8°
Gymnogongrus sp.	+	+	+	218—9°	−39.6°
Lomentaria catenata	+	+	+	220°	−40.2°
Gracilaria textorii	+	+	+	219°	−39.4°

Daraus kann man mit grosser Wahrscheinlichkeit schliessen, dass die Cellulose den allgemeinen Bestandteil der Zellmembran von Florideen darstellt.

c) Interzellularsubstanz

Darstellung

Die Interzellularsubstanz lässt sich leicht mit heissem Wasser extrahieren. Dazu wurden die lufttrockenen Algen mit je 30-facher Menge von Wasser 14-mal auf dem siedenden Wasserbade extrahiert. Der heiss filtrierte Auszug wurde vereinigt und im Vakuum eingedampft, wobei die Flüssigkeit beim Erkalten zu Gallert erstarrte. Dazu wurde nun zweifache Menge von Aceton zugesetzt, stark umgerührt und einige Stunden stehen gelassen. Darnach wurde das Koagulum im Koliertuch abgepresst und erneut mit Aceton entwässert, wobei die farbigen Verunreinigungen grossenteils entfernt wurden. Weiterhin erwärmte man das Produkt mit 95-proz. Äthanol auf 50° und trocknete, nach Behandlung mit Äther, im Exsikkator.

TABELLE XXIV

Analyse der Interzellularsubstanz
(Die Zahlen bedeuten % an Trockensubstanz)

Asche	19.4
Gesamt-N	0.72
Pentosan	1.01
Methylpentosan	Spur
Organisches SO_4 (Hydrolyse)	29.8
,, ,, (Veraschung)	11.8
Gesamtzucker (als Galaktose)	49.1

An einer anderen kleinen Portion des Ausgangsmaterials wurde die Ausbeute bestimmt: 11.2144 g der völlig getrockneten Alge gaben 10.3624 g der Substanz. Ausbeute 92.4%.

Also macht die Interzellularsubstanz die Hauptmasse des Thallus aus.

Das erhaltene Produkt ist noch schwach bräunlich gefärbt. Es enthält kein freies Sulfat.

Der Gehalt an organisch gebundenem Sulfat ist sehr hoch. Berücksichtigt man den Sulfatgehalt der Gesamtalge (25.4%) und den Gehalt der Interzellularsubstanz, so liegt es nahe anzunehmen, dass das gesamte organische Sulfat als Bestandteil der Interzellularsubstanz enthalten ist.

Aus dem Mengenverältnis, Asche-SO_4: Gesamt-SO_4, kann man mit Wahrscheinlichkeit schliessen, dass die Schwefelsäure in der Interzellularsubstanz, wenigstens zum Teil, in Form von saurem Ester vorliegt. Dieser Umstand wird auch aus dem folgenden Befund wahrscheinlich gemacht. Fällt man die wässrige Lösung dieser Substanz mit salzsäure-

haltigem Alkohol und wäscht mit Alkohol zur Cl-Freiheit, so erweist sich das Produkt an sich als sauer reagierend, indem das pH der 1-proz. Lösung als 2.5 ermittelt wird.

Hydrolyse

40 g lufttrocker Substanz wurden mit 800 ccm 3-proz. Schwefelsäure auf dem siedenden Wasserbad solange erhitzt, bis das Reduktionsvermögen der Lösung nicht mehr zunimmt, wozu etwa 15 Stunden erforderlich waren. Das Hydrolysat wurde mit Barytwasser neutralisiert und die von Bariumsulfat abfiltrierte Lösung mit Bleiacetat gereinigt. Die mit Tierkohle entfärbte Lösung engte man zum dünnen Sirup ein und tropfte unter heftigem Umrühren in etwa 10-fache Menge von 96-proz. Alkohol hinein, wobei ein flockiger Niederschlag entstand, der nach Stehen übernacht klebrig wurde. Die überstehende alkoholische Lösung wurde abermals mit Tierkohle behandelt und im Vakuum fast zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in Wasser gelöst und auf 200 ccm aufgefüllt. An einem Aliquot bestimmte man den Zuckergehalt. Es wurden insgesamt 10.948 g Zucker als Galaktose gefunden.

Drehung:

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{+3.56^\circ \times 100}{5.474 \times 1} = +65.0^\circ .$$

Qualitative Reaktionen:

SELIWANOFFsche Reaktion nach Ketose	+
PINOFFsche Reaktion nach Ketose	±
Phloroglucinreaktion nach Pentose	+
BIALsche Orcinreaktion nach Pentose	±
ROSENTHALERsche Reaktion nach Methylpentose	−
Naphthoresorcinreaktion nach Uronsäure	−

Nachweis der Zuckerarten:

Zu 10 ccm Zuckerlösung wurden 1 ccm Phenylhydrazin und 5 ccm 30-proz. Essigsäure zugesetzt und bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach 4.5 Stdn. wurde kein Niederschlag von Phenylhydrazonkrystalle erzeugt. Es wurde dann auf dem siedenden Wasserbad erwärmt, wobei sich gelbe Osazonkrystalle ausschieden. Sie wurden filtriert, mit Wasser und mit eiskaltem Aceton nachgewaschen, wodurch der Grossenteil in Acetonlösung überging. Der geringe Rückstand wurde aus 60-proz. Alkohol zu goldgelben, etwas breiten Nadeln vom Schmelzpunkt 184–187° umkrystallisiert. Das Produkt stellte also Galaktosephenylosazon dar.

Zu 30 ccm Zuckerlösung wurden 10 ccm konzentrierte Salpetersäure (sp. Gew. 1.4) zugesetzt und gewöhnlicherweise auf dem Wasserbad

oxydiert. Dabei wurde eine beträchtliche Menge von Schleimsäure gebildet, die durch Umfällen aus der alkalischen Lösung mit Salzsäure gereinigt und durch Schmelzpunkt von 217° identifiziert wurde.

100 ccm Zuckerlösung wurden mit 5 ccm *α*-Methylphenylhydrazin und 96-proz. Äthanol zur klaren Lösung versetzt, kurz erwärmt und bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Beim Stehen übernacht wurde die Flüssigkeit zu einer bräunlichen Krystallmasse erstarrt, welche mit 70-proz. Äthanol angerührt, stark abgesaugt und mit 96-proz. Äthanol nachgewaschen wurde. Das noch schwach bräunliche Produkt wurde dann zweimal durch Umlösen aus 30-proz. Äthanol zu farblosen Blättchen vom Schmelzpunkt 185° gereinigt. Bei der Mischprobe mit dem reinen *d*-Galaktose-*α*-Methylphenylhydrazon vom Schmelzpunkt 188° zeigte sich keine Depression.

Aus diesen Resultaten ist zu ersehen, dass das Vorhandensein der Galaktose sicher ist, dagegen das der Glucose, Mannose Fructose und Fukose zweifelhaft bleibt.

In Anbetracht meines Befundes, dass die Interzellularsubstanz von *Porphyra tenera* *d,l*-Galaktose als Hauptkomponente enthält, erscheint es mir wünschenswert, festzustellen, ob das erhaltene *α*-Methylphenylhydrazon das Derivat der *d*-Galaktose oder das der *d,l*-Galaktose ist.

Dazu wurden 4 g *α*-Methylphenylhydrazon mit dem üblichen Benzaldehydverfahren in freien Zucker zurückgewandelt. Dabei wurden 2 g krystallisierten Zuckers erhalten, der, nach Umkrystallisieren aus 90-proz. Äthanol bei 162° schmolz.

Drehung:

$$[\alpha]_D^{17} = \frac{+2.66° \times 100}{3.344 \times 1} = +79.5°.$$

Also ist das Produkt reine *d*-Galaktose.

Das Filtrat aus dem *d*-Galaktose-*α*-Methylphenylhydrazon wurde zur Beseitigung des Hydrazins mit Benzaldehyd behandelt und der Überschuss des letzteren durch Ausäthern beseitigt. Die noch schwach braun gefärbte Lösung wurde mit Tierkohle entfärbt und damit wurden folgende Reaktionen geprüft.

SELIWANOFFsche und PINOFFsche Reaktion nach Ketose	—
Phloroglucin- und Orcinreaktion nach Pentose	—
ROSENTHALERsche Reaktion nach Methylpentose	—

Drehung:

Der Zuckergehalt der Lösung wurde nach BERTRAND bestimmt und als Glucose ausgedrückt.

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{+0.36^\circ \times 100}{0.742 \times 1} = +48.5^\circ .$$

Dazu wurden Phenylhydrazin und Essigsäure zugesetzt und bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach Stehen übernacht wurde kein Hydrazon erzeugt. Es wurde dann auf dem siedenden Wasserbad erwärmt, wobei erst nach Erkalten gelbe Osazonkrystalle gebildet wurden. Nach zweimaligem Umkrystallisieren aus 30-proz. Äthanol, schmolz das Produkt bei 175–8°. Durch weiteres Umlösen aus 40-proz. Äthanol konnte der Schmelzpunkt nicht mehr gesteigert werden. Obschon dieser Schmelzpunkt dem der Rhamnose (182°) und dem der Fukose (177.5°) nahe steht, so scheint doch aus dem negativen Ausfall der ROSENTHALERschen Reaktion das Vorhandensein der Methylpentosen zu verneinen. Daher bleibt die chemische Natur der Muttersubstanz von diesem Phenylosazon noch festzustellen.

An dem gereinigten Hydrolysat der Interzellularsubstanz wurde der Gehalt der Galaktose nach der NEUBERGschen Methode mittels α-Methylphenylhydrazons bestimmt.

10 ccm Zuckerlösung gaben

Gesamtzucker (an einer anderen Portion nach BERTRAND bestimmt) 487 mg als Galaktose.

Galaktose-α-Methylphenylhydrazon 669.0 mg.

Daraus ergibt sich

Galaktose 424.3 mg, entsprechend 87.1% des Gesamtzuckers.

Also besteht der Hauptteil der Zuckerkomponenten der Interzellularsubstanz aus *d*-Galaktose.

d) Interzellularsubstanz der anderen Florideen

Um festzustellen, ob die Interzellularsubstanz der anderen Florideen auch *d*-Galaktose als Komponente enthält, wurden die folgenden Algen als Versuchsobjekt herangezogen.

Lomentaria catenata,
Carpopeltis crispata,
C. cornea,
Gymnogongrus sp.

Je 5 g lufttrockene Alge wurden mit 300 ccm 5-proz. Salzsäure übergossen und 4 Stdn. bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Darnach wurde die Salzsäure abgegossen und der Rückstand mit Wasser gewaschen. Dazu setzte man je 250 ccm Wasser hinzu und 1.5 Stunden im Autoklav bei 120–125° erhitzt. Zu jedem filtrierten Extrakt wurden nun 5 ccm

konz. Schwefelsäure zugesetzt und wiederum 2-stundenlang bei 120–125° autoklaviert. Aus dem Reaktionsprodukt wurde die Zuckerlösung gereinigt erhalten, die dann sowohl zur Bestimmung des Drehungsvermögens als auch zum Galaktosenachweis mittels *α*-Methylphenylhydrazins diente. Die Resultate werden in der folgenden Tabelle zusammengestellt, wobei der Zuckergehalt der Lösung zur Berechnung der spezifischen Drehung nach BERTRAND bestimmt und als Galaktose angegeben wurde. Vergleichsweise werden auch die bei *Gigartina tenella* ermittelten Zahlen wiedergegeben.

TABELLE XXV

Alge	$[\alpha]_D$	Schmelzpunkt von α-Methylphenylhydrazon
Lomentaria catenata	+42.7°	190°
Carpopeltis crispata	+50.7°	188°
Carpopeltis cornea	+24.0°	187–188°
Gymnogongrus sp.	+39.5°	187°
Gigartina tenella	+65.0°	185°

Daraus ist zu erschen, dass die Galaktose bei allen untersuchten Algen als Bestandteil der Interzellularsubstanz vorkommt. Aus den mehr oder weniger stark wechselnden Werten der Drehung ist zu vermuten, dass entweder linksdrehende oder schwächer als *d*-Galaktose rechtsdrehende Zucker oder die beiden je nach der Art der Algen in wechselnden Mengen neben *d*-Galaktose enthalten sind.

e) Mikrochemische Versuche

Wie oben gezeigt, enthält der Thallus von *Gigartina tenella* mehr als 90% der heisswasserlöslichen Interzellularsubstanz und nur 1.8% der Cellulose. Mikrospopisch lässt sich zeigen, dass die einzelnen Zellen in der grossen Grundmasse der Interzellularsubstanz eingebettet vorliegen, so dass die Gewebestruktur durch Lösen der letzteren nahezu zerstört wird.

Die äusserste, den Thallus umhüllende Zellhaut stellt eine ziemlich feste Membran dar, die durch heisses Wasser gar nicht, auch selbst durch heisse 1.25-proz. Natronlauge oder Schwefelsäure kaum angegriffen wird. Sie färbt sich mit Chlorzinkjod sowie Jod und Schwefelsäure stark braun, dagegen mit Sudan III gar nicht.

Die Zellulosemembran schliesst unmittelbar das Protoplast um, was sich durch Blau- und Violettfärbung mit Jod-Schwefelsäure bzw. Chlorzinkjod leicht erkennen lässt.

Die Interzellularsubstanz ist leicht quellbar. Die Quellung findet statt schon beim Tauchen der Thallusschnitte in destilliertes Wasser, aber besonders stark, wenn man sie vorher mit verdünnter Salzsäure kurz behandelt. Analog der Interzellularsubstanz der Braunalgen erscheint die Annahme auch naheliegend, dass das an der freien Säuregruppe der Esterschwefelsäure gebundene Calcium darin eine Rolle spielt. Tatsächlich kann man das Vorhandensein von Calcium in der Interzellularsubstanz leicht nachweisen, wenn man auf die Thallusschnitte verdünnte Lösung von gepuffertem Ammonoxalat zutropft. Es treten fast sofort in dem Interzellularraum kleine Kryställchen von Calciumoxalat auf, die in Essigsäure nicht, sondern in Salzsäure leicht löslich sind. Durch Vorbehandlung der Thallusschnitte mit verdünnter Salzsäure bleibt die Krystallbildung völlig aus.

Die Säurenatur der Interzellularsubstanz lässt sich durch Bildung des Berlinerblaus leicht erkennen. Dazu wird die Thallusschnitte zunächst mit verdünnter Salzsäure kurz behandelt und nach Waschen mit Wasser in verdünnte Lösung von Ferrocyankalium getaucht. Dabei färbt sich die Interzellularsubstanz deutlich blau.

f) Besprechung

Die Zellwand von *Gigartina tenella* besteht im wesentlichen aus Cellulose und Interzellularsubstanz.

Der eindeutige Nachweis der Cellulose wurde an dem gereinigten Faserstoff durch Acetolyse erbracht, indem reine α-Octacetylcellobiose isoliert und durch Bestimmung des Schmelzpunkts und der spezifischen Drehung identifiziert wurde. Mikrochemisch wurde gezeigt, dass die Cellulosemembran jedes Protoplast direkt umgibt, was mit den Angaben der früheren Forscher übereinstimmt.

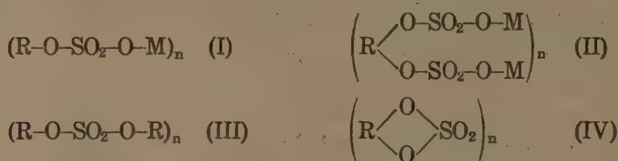
Ausser bei *Gigartina tenella* wurde die Existenz der echten Cellulose auch bei *Lomentaria catenata, Carpopeltis crispata, Carpopeltis cornea* und *Gymnogongrus* sp. auch mit Hilfe der Acetolysemethode festgestellt. Dies zusammen mit den Angaben von NAYLOR und RUSSEL-WELLS,[(1)] bei denen das Vorhandensein von Cellulose in *Corallina officinalis, Bostrychia scorpioides* und *Rhodymenia palmata* beobachtet wurde, lässt uns mit grosser Wahrscheinlichkeit schliessen, dass die Cellulose als einen allgemeinen Membranstoff von Florideen anzusehen ist.

Die Interzellularsubstanz, welche, der Menge nach, den Grossenteil (92.4% der trockenen Alge) des Algenkörpers ausmacht, ist sehr schleimig und lässt sich mit heissem Wasser vollständig extrahieren. Diese Sub-

---

(1) Ann. Bot., **48**, 635 (1934).

stanz stellt einen Polysaccharid-schwefelsäureester dar, dessen Sulfatgehalt 29.8% beträgt. Das Sulfat in der Asche wurde zu 11.8% gefunden. Diese Zahlen stehen denjenigen nahe, die von M. R. BUTLER[1] bei dem Schleimstoff von *Chondrus crispus* erhalten wurden. Dass das Aschensulfat im Vergleich mit dem durch Hydrolyse gefundenen weit zurücksteht (1:2.53), lässt uns vermuten, dass die Schwefelsäure in dieser Interzellularsubstanz in Form des sauren und zum Teil auch des neutralen Esters vorliegt. Als wahrscheinliche Formen des Schwefelsäureesters kann man folgende Bindungsarten annehmen, von denen I und II saure Ester und III und IV neutrale Ester darstellen. Indessen bleibt die Bindungsform der Interzellularsubstanz von *Gigartina tenella* heute noch offen.



R = Zuckerrest, M = Metall.

Bei der Hydrolyse liefert diese Substanz 49.1% der reduzierenden Zucker, von denen *d*-Galaktose 87.1% ausmacht. Wie eingangs erwähnt, gibt es bis jetzt manche Angaben bezüglich des Vorkommens der Galaktose in Florideen. Eigene Versuche haben auch gezeigt, dass alle untersuchte Florideen, *Gigartina tenella, Lomentaria catenata, Carpopeltis crispata, Carpopeltis cornea, Gymnogongrus* sp., ohne einzige Ausnahme die Galaktose als Komponente der Interzellularsubstanz enthalten. Demzufolge scheint es mir berechtigt zu sagen, dass das Vorkommen einer schleimigen Interzellularsubstanz, welche *d*-Galaktose als Hauptkomponente enthält, als ein wesentliches Charakteristikum der Florideen anzusehen ist.

Wie oben beschrieben, ist die Interzellularsubstanz der *Porphyra*arten, die Bangiales gehören, weniger schleimig und enthält als Hauptkomponente, anstatt *d*-Galaktose, razemische Galaktose. Vom botanisch-systematischen Standpunkt aus betrachtet, scheint dieser Befund insofern interessant, als die beiden grossen Gruppen der Rotalgen zwei voneinander nahe verwandte, jedoch nicht identische Zuckerarten führen.

Rückblick

Als Zellmembranbestandteil der höheren Pflanzen ist bisher das ubiquitäre Vorkommen der Cellulose und der Pektinstoffe bekannt. In den

(1) Biochem. J., **28**, 759 (1934).

meisten Fällen sind aber auch diese Membranstoffe von verschiedenen Hemicellulosen, wie Mannan, Galaktan, Araban, Xylan, Polyuronide u.a., begleitet, die teils Reserve-, teils Gerüststoff sind. Ferner gibt es auch Membranstoffe, die zur Befestigung der Gewebe oder zum Schützen gegen äussere Angriffe sowie gegen Wasserverlust dienen. Dazu gehören Lignin, Kutin und Suberin. Ausserdem kommen auch Umwandlungsprodukte der Membranbestandteile, die sogenannten „Membranschleime", ziemlich weit verbreitet vor.

In den Algen finden sich auch einige Membranstoffe, die denen der höheren Pflanzen entsprechen. Dazu zählt man Cellulose, Pektinstoffe, Hemicellulosen und Membranschleime, während die Existenz von Lignin, Kutin und Suberin zweifelhaft ist. Die chemische Natur von „Algen-Kutikula" dürfte allem Anschein nach nicht mit der der höheren Pflanzen identisch sein, sondern sie ist als eines der komplexen Polysaccharide anzusehen.

Cellulose

Betreffs der Cellulose der Algen, die bisher zumeist nur mikrochemisch nachgewiesen worden ist, scheint die Frage noch nicht ausser Zweifel beantwortet zu werden, ob sie mit der der höheren Pflanzen chemisch identisch ist. Besonders ist diese Frage bei den Braunalgen strittig, indem einige Forscher das Vorkommen der echten Cellulose ganz verneint haben. Bei der vorliegenden Arbeit wurde aber makrochemisch festgestellt, dass die Fasersubstanz von Braunalgen und von Florideen echte Cellulose ist. Ausserdem wurde auch wahrscheinlich gemacht, dass die Cellulose einen allgemeinen Membranbestandteil der Phaeophyceen und der Florideen darstellt. Jedoch scheint sie bei Bangiales, wenigstens bei *Porphyra,* nicht vorzukommen.

Obschon die Cellulose sich bei den oben genannten Algengruppen mit Sicherheit nachweisen liess, so steht doch ihre Gehalt dem höheren Pflanzen sehr weit zurück. So findet man den Cellulosegehalt der meisten Braunalgen zu 5–15% und den der Florideen zu 1.5–3%.

Die Lokalisation der Cellulose in der Zellhaut wurde mikrochemisch untersucht, woraus sich, in Übereinstimmung mit den Angaben der früheren Forscher, ergab, dass die Cellulose die innerste, das Protoplast unmittelbar umgebende Zellhaut bildet.

Pektinstoffe

Die Pektinstoffe sind längere Zeit ebenfalls nur mikrochemisch nachgewiesen worden. Neuere Untersuchungen über das eigentliche Pektin der höheren Pflanzen haben gezeigt, dass der wesentliche Bestandteil desselben *d*-Galakturonsäure ist.[1] Da man aber mit Wahrscheinlichkeit

(1) F. Ehrlich in Kleins Handb. d. Pflanzenanal., Bd. III, 1, S. 80.

annehmen kann, dass die Färbung des Pektins mit Rutheniumrot sowie mit den basischen Farbstoffen wohl auf seine Säurenatur beruht, so ist man nicht ohne weiteres imstande, auf Grund solcher mikrochemischen Reaktionen allein über die chemische Natur der anderen Pektinstoffe etwas bestimmtes auszusagen.

Was die „Pektinstoffe der Algen" anbetrifft, so sind sie voneinander und auch von dem Pektin der höheren Pflanzen chemisch recht verschieden, obzwar sie Interzellularsubstanz von Säurenatur sind.

Das Pektin der Braunalgen ist durch Alginsäure vertreten, die jetzt als ein Polymeres der *d*-Mannuronsäure aufgefasst wird. Im Gegensatz hierzu ist das Pektin der Rotalgen nicht ein Polyuronid, sondern eine Polysaccharidschwefelsäure, deren Hauptkohlenhydratkomponente entweder razemische oder rechtsdrehende Galaktose ist. Mikrochemisch wurde nachgewiesen, dass die Pektinstoffe zum Teil in Verbindung mit Calcium vorkommen, was für die Beständigkeit der Gewebestruktur eine hervorragende Rolle spielt.

Beiläufig sei über die Definition des „Pektins" kurz erwähnt. Wenn man das Pektin als ein Polyuronidkomplex, dessen Grundbaustein *d*-Galakturonsäure ist, definieren will, so sollen die Braun- und Rotalgen kein Pektin führen. Definiert man dagegen das Pektin als eine polysaccharidartige Mittellamellen- bzw. Interzellularsubstanz von Säurenatur, so können sowohl die Alginsäure der Braunalgen als auch das saure Polysaccharidsulfat der Rotalgen auch Pektinstoff sein. Jedenfalls scheint die physiologische Rolle dieser verschiedenen „Pektinstoffe" dieselbe zu sein.

Membranschleim

Der Schleimgang der Braunalgen enthält wasserlösliche, sehr visköse Substanzen von Säurenatur, die, analog dem Membranschleim der höheren Pflanzen, als sekundäres Umwandlungsprodukt der Zellwandbestandteile aufgefasst wird. Für die Säurenatur ist aber die Uronsäure hierbei nicht verantwortlich, wie es bei den meisten höheren Pflanzen der Fall ist, vielmehr beruht sie auf Vorhandensein von Polysaccharidschwefelsäure. Als Kohlenhydratkomponente wurde stets *l*-Fukose nachgewiesen, wobei sich das molekuläre Verhältnis, Fukose: Sulfat, bei *Macrocystis pyrifera, Fucus evanescens* und *Eisenia bicyclis* als 1:1 erwies. Daraus erscheint die Annahme naheliegend, dass *l*-Fukose den wesentlichen Bestandteil des Schleimstoffs von Braunalgen darstellt. Andererseits hat es sich auch gezeigt, dass sich der Schleimstoff aus *Eisenia* und *Laminaria* von dem aus *Macrocystis* und *Fucus* dadurch unterscheidet, dass der erstere ausser Fukose eine nicht unbeträchtliche Menge von Glucose enthält. Dieser Umstand lässt uns vermuten, dass die Membranschleime von verschiedenen Braunalgen mit einander nicht immer identisch sind.

Polysaccharidsulfat

Im tierischen Organismus kommen zwei Arten von Polysaccharidschwefelsäureester vor, welche die prosthetische Gruppe der Glucoproteide, Chondro- und Mucoproteid, bilden. Das Chondroproteid ist ein Gerüststoff, der den wesentlichen Bestandteil des Knorpels, der Sehne u.a. bildet, während das Mucoproteid die Hauptkomponente des tierischen Schleims darstellt. Obzwar der Polysaccharidschwefelsäureester der Pflanze mit Eiweiss nicht gepaart ist, so findet man doch eine interessante Analogie mit dem des tierischen Organismus darin, dass der eine den Gerüststoff (Interzellularsubstanz der Rotalgen) und der andere die Schleimsubstanz (Membranschleim der Braunalgen) bildet.

Im Pflanzenreich ist das Polysaccharidsulfat bis jetzt ausschliesslich bei den Algen bekannt. Ausser der Braun- und Rotalgen kommt es auch in den meisten Grünalgen vor. Dabei scheint der Befund bemerkenwert, dass der Gehalt an Polysaccharidsulfat von *Enteromorpha compressa* bei der Süsswasserform viel geringer ist als bei der Meerwasserform und ferner dass es bei einer Süsswasseralge, *Prasiola japonica,* fehlt. Dennoch bleibt die Frage noch klarzulegen, ob das Vorkommen des Polysaccharidsulfats in irgendeinem Zusammenhang mit dem Leben der Pflanze in Meerwasser steht. Allerdings scheint diese Verbindung einen charakteristischen Membranstoff der Algen darzustellen.

Zur systematischen Bedeutung des Membranstoffs

Von botanisch-systematischem Standpunkt aus betrachtet, ist auch die chemische Natur der Membranstoffe von Braun- und Rotalgen sehr interessant. Entsprechend dem Unterschied in Chromatophorenfarbstoff, in morphologischen Eigenschaften sowie auch in Fortpflanzungsmodus, besteht zwischen Braun- und Rotalgen auch ein ausgeprägter Unterschied bezüglich der Interzellularsubstanz, indem die Alginsäure bei Braunalgen und das Polysaccharidsulfat bei Rotalgen, welches Galaktose als Hauptkomponente enthält, je charakteristischen Membranstoff darstellen.

Auch zwischen beiden grossen Gruppen von Rotalgen, Bangiales und Florideae, bemerkt man einen deutlichen Unterschied in bezug auf Interzellularsubstanz und Cellulose. Die Interzellularsubstanz der beiden Gruppen ist insofern gleich als sie ein saures Polysaccharidsulfat darstellt. Der Unterschied liegt darin, dass in Bangiales die razemische Galaktose als wesentlicher Kohlenhydratbestandteil vorkommt, während in Florideae die rechtsdrehende an seiner Stelle tritt. Was die Cellulose anbetrifft, so steht das allgemeine Vorkommen in Florideae in ausgeprägtem Gegensatz zum Fehlen in Bangiales.

Daraus kann mit Recht gefolgert werden, dass die chemischen Eigenschaften der Membranstoffe auch ein wichtiges Merkmal für Systematik der Pflanzen darstellen können.

Karyological studies in *Crocus* II

By K. KARASAWA

With 73 text-figures

(Received July 15, 1940)

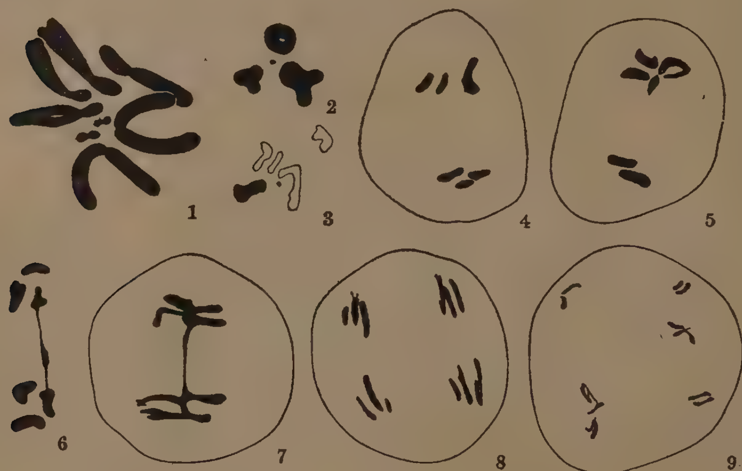
In the last publication of this series (1937), I described the results of my karyological observations of 13 *Crocuses* that are not commonly cultivated in our gardens. Recently I extended my studies of 8 *Crocuses* and some of their garden varieties, the results of which are given here. The materials were obtained from BARR & Sons and C. G. VAN TUBERGEN, as before (cf. KARASAWA, 1937). The expenses of this study were partly granted from the Imperial Academy, to which I wish to express my best thanks.

Observations

1. *Crocus hyemalis*

Whereas MATHER (1932) counted six chromosomes and four fragments in this *Crocus*, I have seen six somatic chromosomes and two fragments (Fig. 1). Recently, however, PROPACH (1939) observed two other chromosomal types, namely, 6 and 6+3 fragments. These differences in the chromosome number may be due to differences in the materials used. The somatic complement consists of one pair of V-shaped chromosomes, another of short-armed, still another having heads, and two dumb-bell shaped fragments, as seen in Fig. 1. At the metaphase of the first division, three bivalents and one fragment (two valences) were observed (Fig. 2), although in a few cases univalent chromosomes appeared (Fig. 3). Owing to the minute size of the fragments, their behavior during meiotic division could not be observed. Three bivalents divided normally in most cases (Fig. 4), though sometimes the chromosomes separated unequally (Fig. 5). In some figures, either chromosome bridge or laggard was observed (Figs. 6–7). In most figures (Fig. 8), the second division occurred regularly, although abnormal behavior of the chromosome was

observed in a few cases (Fig. 9). The mature pollen grains had greatly shrunk as a result of the abnormal chromosome behavior, and also



Figs. 1–9. *Crocus hyemalis*. 1, Somatic equatorial plate, showing six chromosomes and two fragments. ×2400. 2, Three bivalents and one fragment (two valences) at the first metaphase. 3, Meiotic chromosomes consisting of one bivalent, four univalents (shown in outline) and one fragment (two valences). ×1200. 4-5, First division. ×800. 6, Lagging chromosome. ×1200. 7, Chromosome bridge. 8–9, Second division. ×800.

probably owing to the disappearance of the fragments in the cytoplasm. Fertility was very low.

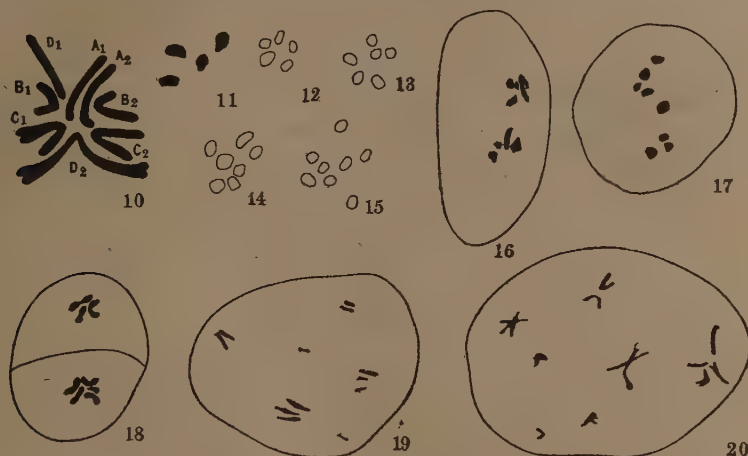
2. *Crocus vernus albus*

This dainty white flowering *Crocus* has eight chromosomes in its somatic cells (Fig. 10), agreeing with MATHER's result (1932). Close observation of this somatic complement showed, however, that a pair of

TABLE 1

Chromosomal elements	4	5	6	7	8	Total
Chromosome conjugations	4_{II}	$3_{II}+2_{I}$	$2_{II}+4_{I}$	$1_{II}+6_{I}$	8_{I}	
Frequency	3	2	1	14	20	40

chromosomes, designated D, was unequal in size, as shown in Fig. 10,—one chromosome of this pair being large and V-shaped. At the first metaphase, the conjugation of the meiotic chromosomes varied with each



Figs. 10–20. *Crocus vernus albus.* 10, Somatic complement (2n = 8). ×2400. 11, Four bivalents at the first metaphase. 12, Three bivalents and two univalents. 13, Two bivalents and four univalents. 14, One bivalent and six univalents. 15, Eight univalents. ×800. 16–18, First division. ×600. 19–20, Second division. ×800.

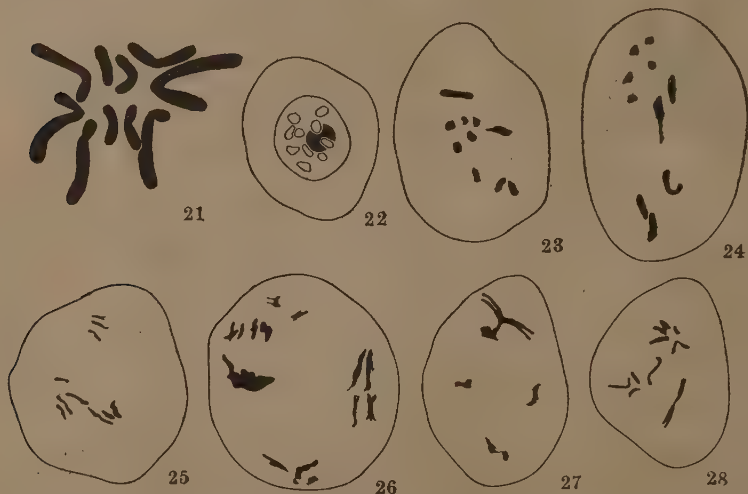
figure (Figs. 11–15), the frequency in the chromosome conjugation being shown in table 1.

The reduction division was abnormal in most figures (Figs. 17–18), although in a few cases the chromosomes separated equally (Fig. 16). Heterotypic division proceeded very irregularly (Figs. 19–20), resulting in shrunken pollen. The herb was highly sterile.

3. A. *Crocus stellaris*

The somatic chromosome number of this herb was found to be ten (Fig. 21), as counted by MATHER (1932). In the first division of meiosis, all meiotic chromosomes appeared as ten univalents (Figs. 22–23). As a rule, the distribution of these univalents was at random (Fig. 24). Second division occurred abnormally (Figs. 25–28). The resulting pollen were markedly deformed. This *Crocus* was completely sterile. As to this herb, BOWLES said in his book "Handbook of Crocus and Colchicum for Gardeners" that "*Crocus stellaris* of HAWORTH is a mysterious plant known only in gardens and nothing at all like it has been found growing wild.

It looks as though it might be a hybrid between *C. susianus* and some form of *C. aureus*, and MAW's objection that there is no authentic record of a hybrid *Crocus* no longer holds goods.—It has become rather scarce of late, and I find it less vigorous than it was twenty years ago and



Figs. 21–28. A. *Crocus stellaris.* 21, Somatic nuclear plate, showing ten chromosomes. ×2400. 22, Diakinesis. 23, Ten univalents at the first metaphase. 24, First division. 25–28, Second division. ×800.

possibly it is on the way to dying out.—It is quite sterile and the anthers and pistil are evidently imperfect being very small and pallid." This description may furnish some clue to the cytology of this *Crocus*.

B. *Crocus stellaris pallidus*

The variety *pallidus* that came from C. G. VAN TUBERGEN proved to have eight somatic chromosomes (Fig. 29). At the first division, eight univalents were usually counted (Figs. 30–31). Meiosis occurred abnormally in the majority of the PMC (Fig. 33), although in a few cases the chromosomes were distributed equally (Fig. 32). Usually second division was irregular (Fig. 34). The mature pollen had greatly shrunk owing to abnormal meiosis.



Figs. 29–34. B. *Crocus stellaris pallidus*. 29, Somatic chromosomes (2n = 8). ×2400. 30, Eight univalents in early metaphase of the first division. 31–33, First division. 34, Second division. ×1200.

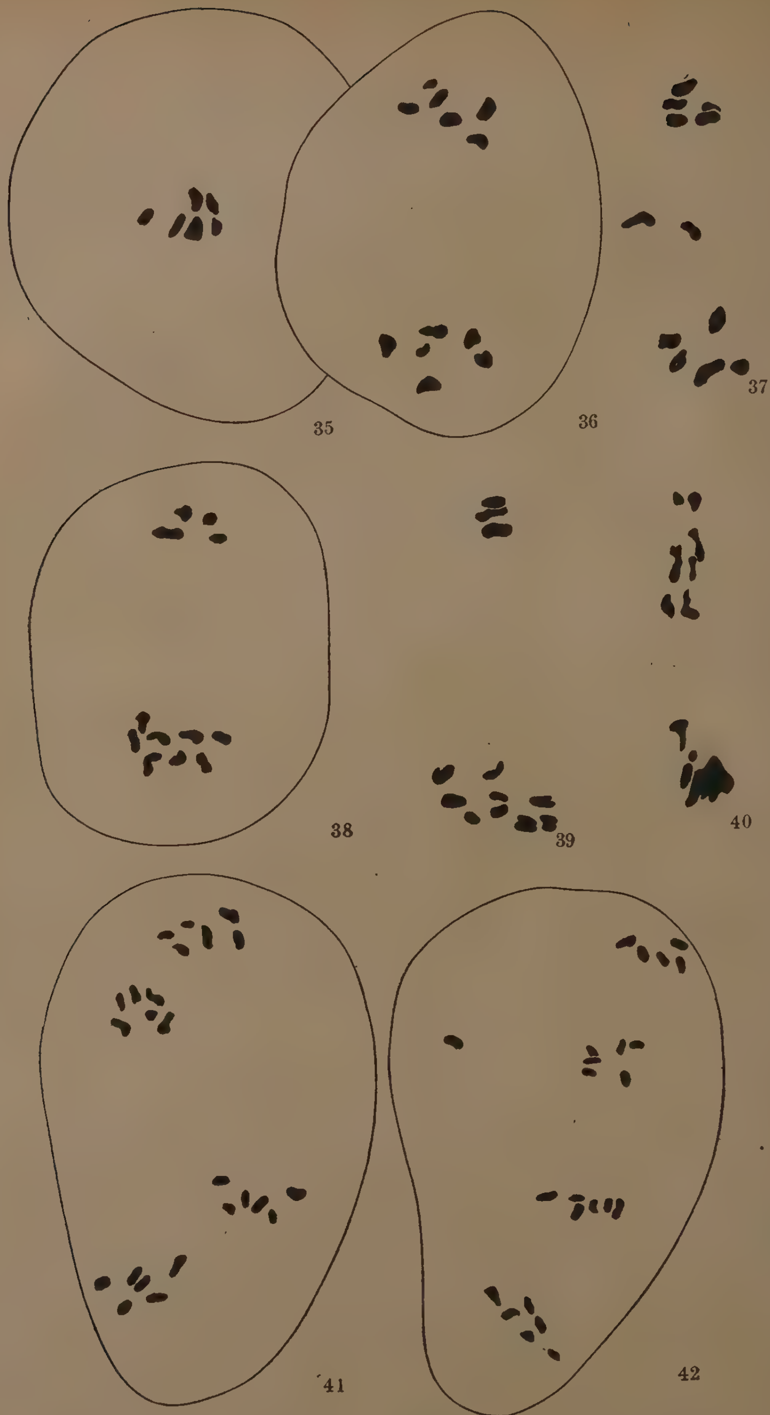
4. A. *Crocus speciosus Aitchisoni* (n=6)

Studying some garden varieties of *C. speciosus*, I found three chromosomal types, the results of which are summarized in table 2.

TABLE 2

Garden varieties / Somatic chromosome numbers	12	14	16
Aitchsioni	+	+	+
Albus	+		
Artabir		+	
Cassiope	+		
Globosus		+	
Pollux			+

Although they differ in flower color, these varieties are not accompanied by any marked morphological differences. In the variety *Aitchisoni*,



Figs. 35–42. A. *Crocus speciosus Aitchisoni* ($n = 6$). 35, Six bivalents at the first metaphase. 36, Normal first division. 37, Two laggards between two poles. 38–39, Non-disjunctions. 40, Abnormal first division. 41–42, Second division. ×1200.

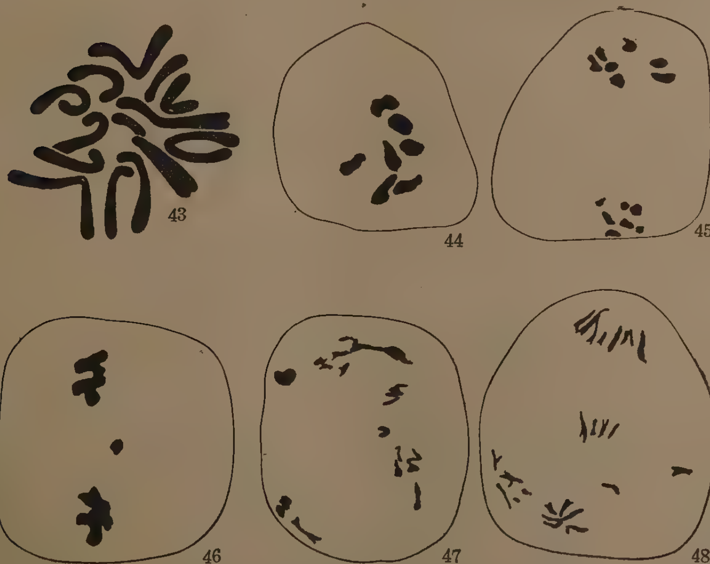
more of the 14 chromosomal type were found than the 12 and 16 chromosomal types. As to the cytology of the variety *Aitchisoni,* at metaphase of the first division, six bivalents were usually observed (Fig. 35). Meiosis occurred regularly in about half the figures (Fig. 36). In the remaining figures, however, the chromosomes were either disjoined unequally (Figs. 38–39) or had lagged (Figs 37, 40). Table 3 shows the frequency in distributions of the chromosomes in the first division.

TABLE 3

Distributions of chromosomes	6–6	7–5	8–4	9–3	Total
Frequency	16	9	2	1	28

In the PMC that had undergone normal first division, second division took place regularly (Fig. 41). In a few cases the chromosomes behaved irregularly (Fig. 42).

B. *Crocus speciosus Aitchisoni* (n=7)

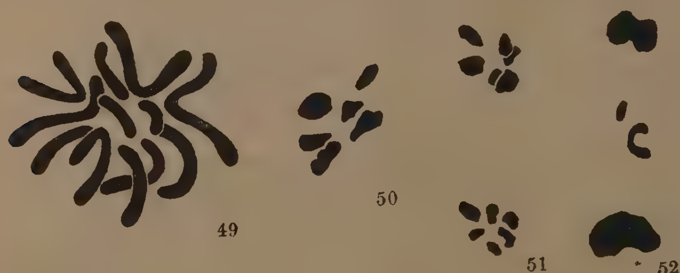


Figs. 43-48. B. *Crocus speciosus Aitchisoni* (n = 7). 43, Somatic equatorial plate, showing 14 chromosomes. ×2400. 44, Seven bivalents at the first metaphase. 45–46, First division. 47–48, Second division. ×800.

Fourteen somatic chromosomes were found in the root tip cells (Fig. 43). Seven bivalents were counted at the first metaphase (Fig. 44). Meiosis was normal in the most of the PMC (Fig. 45). Sometimes, however, abnormal figures were observed both in homotypic as well as in heterotypic divisions (Figs. 46–48). The pollen grains mostly looked normal, although some of them were deformed.

C. *Crocus speciosus albus*

The variety *albus* showed twelve somatic chromosomes in its root tip cells (Fig. 49), as counted by MATHER (1932). At the first metaphase, six bivalents were found (Fig. 50). Meiosis mostly ran a regular course

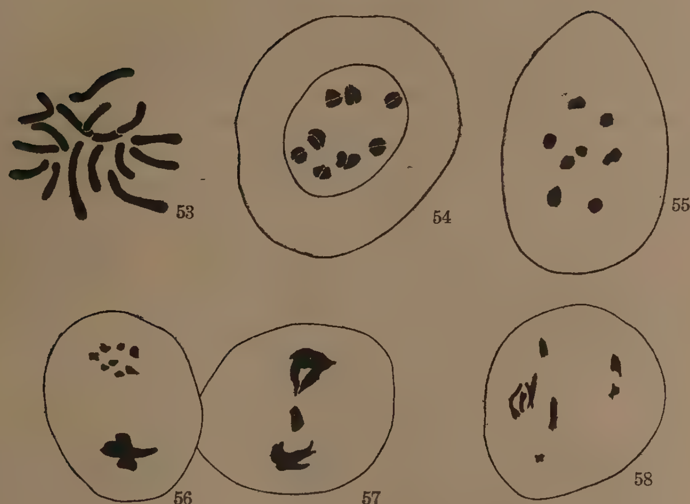


Figs. 49-52. C. *Crocus speciosus albus*. 49, Somatic nuclear plate, showing 12 chromosomes. ×2400. 50, Six bivalents at the metaphase of the first division. 51, Normal first division. 52, Lagging chromosomes between two poles. ×1200.

(Fig. 51), although in some figures (Fig. 52), the chromosomes behaved abnormally.

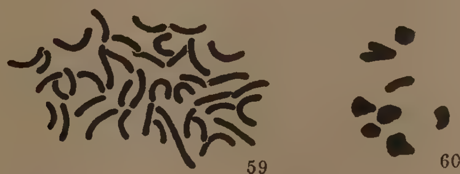
5. *Crocus sativus* "Pallasii of Patras"

A strain of Saffron that was obtained from BARR & Sons under the garden name of "Pallasii of Patras" proved to be diploid, having sixteen somatic chromosomes (Fig. 53), whereas the common Saffron that is cultivated in our gardens (KARASAWA, 1933), as also those from C. G. VAN TUBERGEN (unpublished), were triploid. In diakinesis as well as in metaphase, eight bivalents were usually observed (Figs. 54–55). Reduction division occurred regularly in most of the figures (Fig. 56), resulting in normal pollen tetrads. In a few cases the chromosomes moved abnormally (Figs. 57–58).



Figs 53–58. A. *Crocus sativus* "Pallasii of Patras." 53, Somatic chromosomes (2n = 16). ×2400. 54, Diakinesis. 55, Eight bivalents at the first metaphase. ×1200. 56–57, First division. 58, Laggards. ×800

Another strain of Saffron, also from BARR & Sons, was found to be pentaploid, its somatic chromosome number being forty (Fig. 59). At the metaphase of the first division, eight pentavalent chromosomes were observed (Fig. 60). This pentavalent conjugation may indicate that this

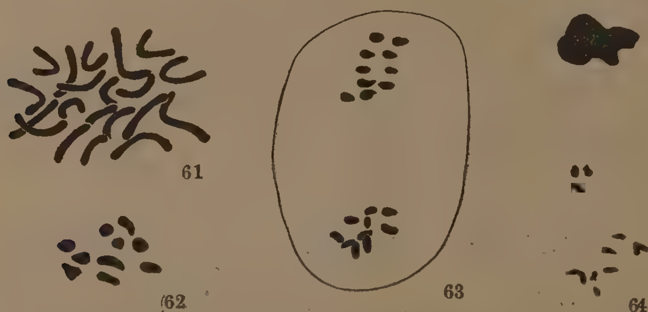


Figs. 59-60. B. *Crocus sativus* (Autopentaploid form). 59, Somatic chromosomes (2n = 40). ×2400. 60, Eight pentavalent chromosomes at the first metaphase. ×1200.

strain is an autopentaploid. Moreover, this form has longer leaves than those of the diploid and the triploid. Consequently, a polyploid series having eight basic chromosome number was found within the same species, *Crocus sativus*, its tetraploid form, however, being not yet found.

6. *Crocus Fleischeri*

The diploid chromosome number of this species, which has peculiar interwoven tunics, and which distinguishes it from other *Crocus* species, was found to be twenty, as shown in Fig. 61. Recently, PROPACH (1939), however, reported that its somatic chromosome number was twenty-eight. Ten bivalents were counted in diakinesis as well as in metaphase (Fig.



Figs. 61–64. *Crocus Fleischeri*. 61, Somatic nuclear plate, showing twenty chromosomes. ×2400. 62, Ten bivalents at the first metaphase. 63, Normal first division. 64, Three lagging chromosomes between two poles. ×1200.

62). Meiosis was mostly normal, the chromosomes being distributed ten each pole (Fig. 63). In some figures the chromosomes behaved irregularly (Fig. 64). Table 4 shows the frequency in the number of young microspores in the PMC.

TABLE 4

Number of young microspores in the PMC	4	5	6	7	8	9	Total
Frequency	68	13	8	4	5	2	100

The mature pollen varied somewhat in size and shape, some of them being shrunken.

7. *Crocus Koralkowii*

A count of the somatic chromosomes of this herb showed twenty (Fig. 65), agreeing with MATHER's result (1932). BRITTINGHAM (1934) also observed the same number of somatic chromosomes in this species. In

the somatic complement of this *Crocus*, two large pairs were found, the corresponding meiotic chromosomes being large, as will be seen from Figs. 66 and 67. In the first metaphase, ten bivalents were usually counted. Reduction division mostly ran a regular course (Fig. 68), although in a

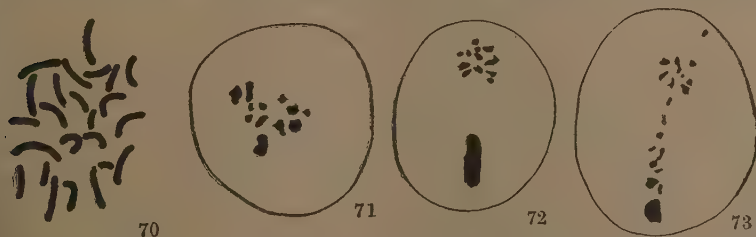


Figs. 65–69. *Crocus Koralkowii.* 65, Somatic chromosomes (2n = 20). ×2400. 66–67, Ten bivalents at the metaphase of the first division. ×1200. 68, Normal first division, showing ten chromosomes in each pole. 69, Non-disjunction, showing eleven chromosomes in upper pole and nine chromosomes in lower pole. ×600.

few cases the chromosomes were disjoined unequally (Fig. 69). The pollen grains were mostly normal in appearance, some of which were deformed.

8. *Crocus Salzmannii erectophyllus*

The chromosome number of this *Crocus* was twenty-four in diploid (Fig. 70) and twelve in haploid (Fig. 71). Reduction division took place regularly in most cases (Fig. 72), though in some figures the chromosomes



Figs. 70–73. *Crocus Salzmannii erectophyllus.* 70, Twenty-four somatic chromosomes. ×2400. 71, Polar view of twelve meiotic chromosomes. 72, First division. 73, Abnormal first division. ×800.

behaved abnormally (Fig. 73). In the species, *C. Salzmannii*, the same numbers of somatic chromosomes and meiotic chromosomes were found, the former agreeing with MATHER's count (1932).

Summary

1. Eight *Crocus* species and some of their garden varieties were studied karyologically, with special reference to the abnormal behavior of the meiotic chromosomes.

2. The somatic chromosome numbers of these *Crocuses* were detected to be 6 and 2 fragments in *C. hyemalis*, 8 in *C. vernus albus*, 8 in *C. stellaris pallidus*, 10 in *C. stellaris*, 12, 14, and 16 in the garden varieties of *C. speciosus*, 16 and 40 in *C. sativus*, 20 in each of *C. Fleischeri* and *C. Koralkowii*, 24 in *C. Salzmannii* and its variety *erectophyllus*, respectively.

3. Irregular behavior during meiotic division, such as non-disjunction, lagging, etc., were observed in all the *Crocuses*. The chromosome behavior of *C. vernus albus* was very abnormal.

4. The meiotic chromosomes of *C. stellaris* and its variety *pallidus* appeared as univalents, their behaviors being quite irregular.

5. A polyploid series with eight basic chromosome number was found within the same species, *Crocus sativus*, although its tetraploid form has not yet been found.

6. The mature pollen grains of *C. hyemalis, C. vernus albus, C. stellaris*, and *C. stellaris pallidus* were markedly deformed on account of their abnormal chromosome behavior. In *C. hyemalis*, especially, disappearance of fragments in the cytoplasm may disturb pollen formation.

Literature cited

Bowles, E. A. (1924). A handbook of *Crocus* and *Colchicum* for gardeners. Hopkinson, London. Pp. 1+185.

Brittingham, W. H. (1934). Cytological studies on some genera of the Iridaceae. Amer. Jour. Bot., **21**: 77–82.

Karasawa, K. (1933). On the triploidy of *Crocus sativus*, L. and its high sterility. Jap. Jour. Genetics, **9**: 6–8.

——— (1937). Karyological studies in *Crocus* I. Jap. Jour. Bot., **9**: 1–15.

Mather, K. (1932). Chromosome variation in *Crocus* I. Jour. Genetics, **26**: 129–142.

Propach, H. (1939). Cytogenetik bei Zierpflanzen. (Sammelreferat). Züchter, **11**: 174–184.

On the fertilization in *Sargassum Horneri* AG.

By Hiroshi KUNIEDA and Shunzo SUTO

With plates I–II

(Received July 30, 1940)

Introduction

Among the Fucaceae, the genus *Sargassum* has been the subject of cytological research in the study of nuclear and cell divisions, but the present state of our knowledge concerning the fertilization is still not perfect.

To quote Miss SIMONS' words (1906), "Whether the sperm enters the egg of *Sargassum* through a break in the oocyst membrane, whether it passes through the membrane, or whether the eggs develop parthenogenetically, is not known."

However, in 1924, KUNIEDA reported the observations of motile spermatozoids in *Sargassum Horneri*. In 1927, TAHARA also observed the multitude of actively swimming spermatozoids, but he failed to observe the discharge of the eggs by the oogonial branches collected a day before the day of liberation and cultured in a glass-vessel. In 1928, KUNIEDA came across the newly discharged oogonia surrounded by numerous swimming spermatozoids and in a number of cases, the spermatozoids were found in the space between the egg and the gelatinous wall. ABE (1938) reported that the spermatozoids were swimming about the eggs of *Sargassum tortile*. Although KUNIEDA (1928) and ABE (1938) found the fusion of the spermatozoids and egg-nucleus in *Sargassum* by cytological research with specimens which were supposed to have completed the fertilization, it has still been difficult to get the control over the fertilization of this plant.

In 1939, we succeeded in obtaining the normal eggs and spermatozoids in the laboratory, and in observing the actual process of fertilization. In the present paper, we shall describe the liberation of the sexual cells and the fertilization exclusively in *Sargassum Horneri* AG., although the study has not yet been completed. *Sargassum Horneri* is very common and is widely distributed on the coasts of Japan. The plant is dioecious, the antheridial and oogonial receptacles being borne on different indivi-

duals. Sexually mature plants are abundant from February to April in the vicinity of the Marine Biological Station at Misaki where our observations and experiments were conducted. It is here acknowledged with gratitude that the present work was completed by the fund offered by Japan Society for Promotion of Scientific Research. We are happy to express our thanks to Dr. K. Dan for his valuable suggestions and kind help during the present investigation.

Oogonial liberation

The oogonial branches were collected a day before the liberation of the oogonia and cultured in the glass-vessels in running sea-water. At about 11 o'clock night, the running water was stopped, so as to avoid the contamination of the spermatozoids from outside. At about midnight, the conceptacles of the receptacle commenced to discharge the oogonia one after another, continuing for several hours. However the oogonial branches cultured in the vessels filled with stagnant sea-water, did not discharge the oogonia. As stated in TAHARA's paper, one discharge does not involve all the oogonia in one receptacle but only a part of them. Thus, discharge takes place periodically a few times before a receptacle is emptied and the discharged portion advances in an acropetal order in one receptacle.

The newly discharged oosphere with eight nuclei is surrounded by a thick mucilaginous substance, having a gelatinous stalk fastened to the interior of the conceptacle. The mucilaginous substance is, in turn, surrounded by a wall (or a membrane) which is sharply defined. But this sharp boundary is lacking at a somewhat basal portion of the oogonium. A few observations on newly discharged oogonia, however, are available in which a sharp boundary first completely surrounded the oogonia which later became invisible at the usual spots. This might be interpreted as due to the fact that the wall or the membrane becomes hydrated or dissolved soon after their escape from the conceptacle. Since all the oogonia which lie in random positions show two dissolved parts of the wall on both sides, it is believed that this dissolved part surrounds the oogonia like a girdle. The width of this girdle corresponds to about one third of the longitudinal axis of the oogonium (Plate I., Fig. 1). On the other hand, the inner mucilaginous substance remains even at the spot where the wall is missing. This is shown by the fact that the particles of India ink can not penetrate but stays away from the oosphere. Therefore the inner gelatinous substance is exposed to sea-water at the dissolved portion through which the spermatozoids would penetrate the oogonium as will be mentioned below.

The liberation of the spermatozoids

The male plants with ripe receptacles were collected and some of them were kept in vessels with running sea-water in a laboratory and some of them were left in the sea being tied with a string. On the day of the liberation of the spermatozoids the receptacles were cut off and cultured in Petri dishes.

The spermatozoids which were liberated were swimming actively between 7 and 9 a.m., but none was seen swimming at night. This was not the case in *Sargassum enerve*, for there the actively moving spermatozoids were obtained in the evening at about 6 o'clock and the liberation of the oogonia began to take place at about 3 p.m., lasting till night.

While the spermatozoid of *Sargassum Horneri* is actively moving, it is more or less fusiform, being about 6–7μ in length. It has two cilia attached at one side which are about 1.5–2 times the length of the body (Pl. II., Fig. 3), and has no eye-spot, without showing a phototactic reaction. One or sometimes two granules are seen in the middle part of the spermatozoid.

Fertilization

The discharged oogonia attached to the surface of the receptacle are rubbed off on a glass slide. Then a drop of the actively swimming spermatozoids is added with a fine pipette. After a short while, the spermatozoids are seen to accumulate at the dissolved portion of the outer wall. There the spermatozoids stop swimming and begin to penetrate gradually into the mucilaginous substance. During the penetration, they elongate taking a somewhat comma-like shape of 8–10μ in length (Fig. 4). Then they swim toward the oosphere, undulating the front cilia and the front portions of the bodies with the hind cilia trailing. It is an interesting fact that the swimming course of the spermatozoids in the mucilaginous substance is spiral as shown in Fig. 2.

The amplitude of the spiral measures about 1.5–2 times the length of the body. However when the spermatozoids approach an inner shining boundary encircling the oosphere, they stop taking a spiral course but they now seem to move back and forth in a semi-circular way. Here the advance of the spermatozoids is very slow. Just how the forward movement can be brought about by this back and forth motion is quite unknown. During the above observations we could neither find the spermatozoids entering the undissolved portion of the gelatinous wall nor going astray from the oosphere within the gelatinous substance. 3–10 minutes are required for the spermatozoids to traverse the mucilaginous layer which is ca. 40 μ

thick before they come in contact with the shining layer above mentioned which will, hereafter, be calld the "peri-oospheric membrane" in the present paper. When the spermatozoids reach the peri-oospheric membrane, they are stopped for a while and then they slowly slip through it. The reason why the authors provisionary call this a membrane is based on the fact that the mucilaginous substance is dissolved in 1 mol. of urea solution (isotonic to sea-water) while this shining boundary remains intact.

Once they slip through this membrane, they are in the last space before having an access to the oosphere. Following the above terminology, this space, for convenience, will be called the "peri-oospheric space." Therefore it is now clear that the discharged oogonium has two layers....the outer mucilaginous one which is very thick and the inner one which is thin (peri-oospheric membrane).

In the peri-oospheric space the spermatozoid regains about the same shape as in the sea-water and moves about as if in search of the entrance to the oosphere (Fig. 5). It is generally observed that several spermatozoids are swimming for a long time in this space. Though the instant of the actual entry of the spermatozoids could not be caught, the spermatozoids were often observed with the front portions of the bodies, each of which changed to an egg-like shape, already in the oosphere (Fig. 6). In a few cases, two spermatozoids penetrate into an oosphere at the same time (Fig. 7). Therefore it was supposed that the polyspermy might occur in the fertilization of *Sargassum.* However it is commonly stated that only one of the spermatozoids, which have succeeded in entering the space will penetrate into the oosphere and fuse with the functional egg-nucleus while seven other nuclei gradually degenerate. Special effort will be directed toward the elucidation of this point in future.

After 10–12 hours of insemination, many eggs become invested with cell walls inside the two layers and the first segmentation begins to take place. About 6 hours later many oogonia develop to the two-celled sporelings. However, if the same batch of oogonia liberated at the same time is examined under a microscope from time to time, it was noticed that the stage of development of the oogonia is not uniform. In other words, in some of them, all the eight nuclei are still intact and in some others, the nuclei had already begun to degenerate while in some others, the first division had already been accomplished. But an examination after 24 hours always revealed that 100% of the oogonia started to develop. Consequently the authors feel that the time of the fertilization or of the initiation of development varies more widely than the time of liberation of the oogonia. More definitely stated, it seems to us that, among the oogonia, which were liberated during one night, most of them were fertilized in the following morning, but a few of them remain unfertilized for 24 hours till the next morning when they seem to receive the sperma-

tozoids. Fig. 8 shows young sporelings developed for about 30 hours after insemination. Fig. 9 represents the control culture without insemination showing eight nuclei. Several days later, the many-celled ellipsoidal sporelings develop and the rhizoids are generally seen to elongate toward the dissolved portion of the mucilaginous wall. The authors hope that the more detailed cytological researches on the fertilization of this plant than hitherto done will be made in future and also that the fertilization of the other species of *Sargassum* and some ones of *Hijikia* will be studied with the present technique.

Summary

1) In *Sargassum Horneri* AG., the conceptacles of the receptacles cultured in a vessel commence to discharge their oogonia at about midnight, continuing for several hours. The spermatozoids are liberated between 7 and 9 o'clock a.m.

2) The discharged oogonium has two enveloping layers. The inner one (the peri-oospheric membrane) is thin and includes the peri-oospheric space. The outer mucilaginous one is very thick and its sharp edge dissolved at a level somewhat basal portion of the oogonium. The dissolved part encircles the oogonium as a girdle of the width of about one third the longitudinal axis of the oogonium.

3) On insemination, the spermatozoids are seen accumulating at the dissolved portion of the outer wall of the oogonium.

4) The spermatozoid elongates within the mucilaginous substance in a comma-shape. The course of advance is first spiral and later semicircular.

5) At the peri-oospheric membrane, the spermatozoid is stopped a short time before they slip through it.

6) Several spermatozoids are found moving about in search of the entrance point to the oosphere within the peri-oospheric space. A spermatozoid is often found with the front portion buried in the oosphere.

7) Cell wall invests the oosphere 10–12 hours after insemination and division takes place about 6 hours later.

Literature cited

ABE, K. (1938): Über die Befruchtung und die ihr folgende erste Teilung bei *Sargassum*. Science Reports of Tôhoku Imp. Univ, 4th Series, Biology. **13**, No. 3.

KUNIEDA, H. (1924): On the spermatozoid of *Sargassum*. Bot. Mag. Tokyo, **38**. (Japanese).

——— (1928): On the development of the sexual organs and embryogeny in *Sargassum Horneri* AG. Journ. Coll. Agri. Imp. Univ., Tokyo. **9**, No. 5.

SIMONS, B. E. (1906): A morphological study of *Sargassum filipendula*. Bot. Gaz. **41.**

TAHARA, M. (1913): Oogonium liberation and embryogeny of some Fucaceous Algae. Jour. Coll. Sci. Imp. Univ. Tokyo. **32**. Art. 9.

——— (1927): Experiments on the eggs of *Sargassum*. Bot. Mag. Tokyo. **41.**

Explanation of plates I–II

PLATE I

Fig. 1. An oogonium about 5 minutes after insemination, showing the dissolved porton of the mucilaginous layer in dotted line. Many spermatozoids are just going to penetrate into the mucilaginous layer and several ones have succeeded in reaching the "peri-oospheric space": d, dissolved portion of mucilaginous layer; m, mucilaginous layer; m.s, mucilaginous stalk; n, nuclei; o, oosphere; p.o.m. "peri-oospheric membrane"; p.o.s. "peri-oospheric space"; sp, spermatozoids. ×150.

Fig 2. The figure shows the swimming course of the two spermatozoids in the mucilaginous layer soon after insemination; d, dissolved portion of the mucilaginous layer; m, mucilaginous layer; o, oosphere; p.o.m., "peri-oospheric membrane"; p.o.s., "peri-oospheric space"; sp. spermatozoid. ×1500.

PLATE II

Fig. 3 Living spermatozoids in sea-water. ×2000.

Fig. 4. Living spermatozoids in the mucilaginous layer. ×2000.

Fig. 5. Living spermatozoids in the "peri-oospheric space". ×2000.

Fig. 6 A part of an oogonium of about 2-hours after insemination with a spermatozoid which is about to enter the oosphere: m, mucilaginous layer; o, oosphere; p.o.m., "peri-oospheric membrane"; p.o.s., "peri-oospheric space"; sp. spermatozoid. ×1200.

Fig. 7 About the same stage as above in which two spermatozoids penetrate an oosphere at the same time: m, mucilaginous layer; o, oosphere; p.o.m., "peri-oospheric membrane"; p.o.s. "peri-oospheric space"; sp, two spermatozoids. × 1200.

Fig. 8 Young sporelings about 30-hours old after insemination. × about 60.

Fig. 9. Control culture of Fig. 8. Eight nuclei are still visible. × about 60.

PLATE I

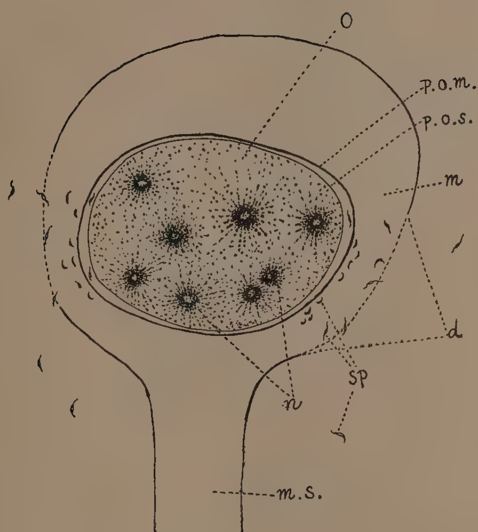


Fig. 1.

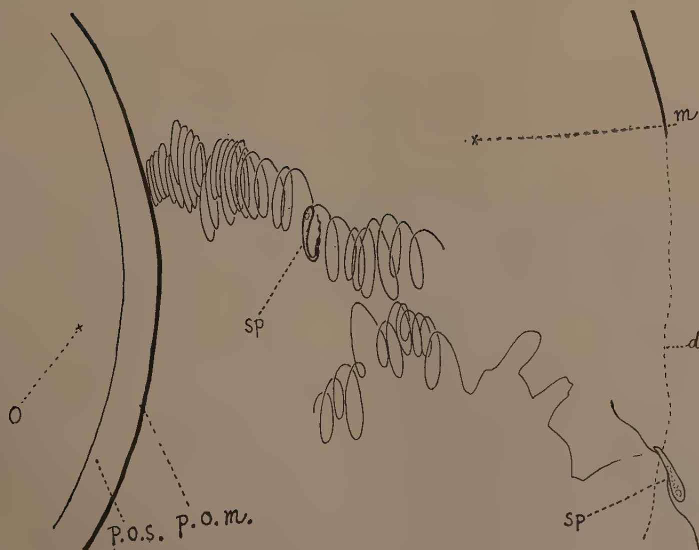


Fig. 2.

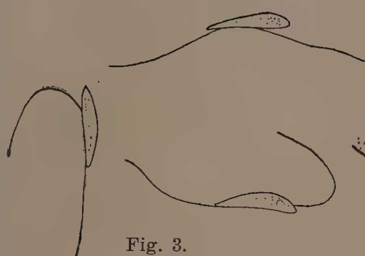


Fig. 3.

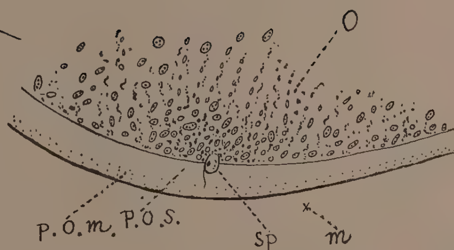


Fig. 6.

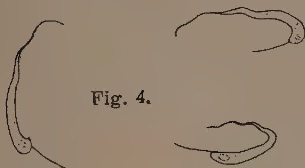


Fig. 4.

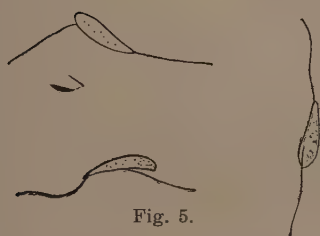


Fig. 5.



Fig. 7.

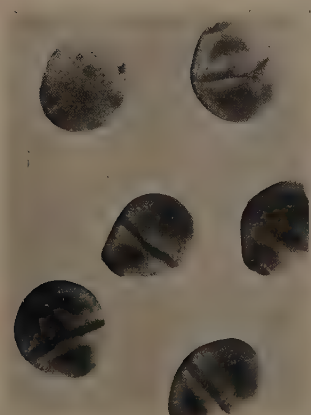


Fig. 8.

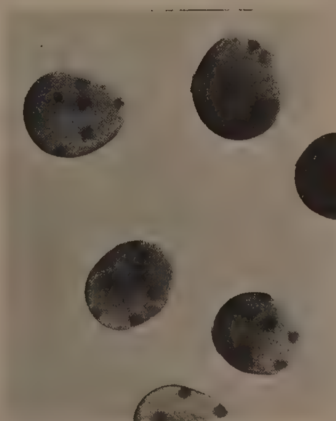


Fig. 9.

ABSTRACTS

Explanation of Abbreviations of the Journals' Names referred in the Abstracts contained in this No.

Abbreviations	*Names of Journals*
A.P.	Acta Phytochimica
A.PP.S.J.	Annals of the Phytopathological Society of Japan (日本植物病理學會報)
A.PT.G.	Acta Phytotaxonomica et Geobotanica (植物分類地理)
A.S.	Agronomic Studies (農學研究)
B.M.T.	The Botanical Magazine (Tôkyô) (植物學雜誌)
B.S.F.T., K.I.U.	Bulteno Scienca de la Fakultato Terkultura, Kyûsyû Imperia Universitato (九州帝國大學農學部學藝雜誌)
B.S.	Bulletin of Sericulture and Silk-Industry (蠶絲學雜誌)
B.Z.	Botany and Zoology (植物及動物)
Cyt.	Cytologia
E.R.	Ecological Review (生態學研究)
Jap.J.B.	Japanese Journal of Botany
J.Jap.B.	Journal of Japanese Botany (植物研究雜誌)
J.J.G.	Journal of Genetics (遺傳學雜誌)
J.S.T.A.	Journal of the Society of Tropical Agriculture (熱帶農業會誌)
M.C.S., K.I.U.	Memoirs of the College of Science, Kyoto Imperial University
M.F.S.A., T.I.U.	Memoirs of the Faculty of Science and Agriculture, Taihoku Imperial University
P.C.S.S.J.	Proceedings of the Crop Science Society of Japan (日本作物學會紀事)
P.I.A.	Proceedings of the Imperial Academy
P.J.S.A.S.	Proceedings of the Japanese Society for the Advancement of Sciences (日本學術協會報告)
Sc. Rpts., T.BR.D.	Science Reports of the Tokyo Bunrika Daigaku, Section B
Sc. Rpts., T.I.U.	Science Reports, Tôhoku Imperial University, Ser. IV
T.N.H.S.F.	Transactions of the Natural History Society of Formosa (臺灣博物學會報)
T.S.H.N.H.S.	Transactions of the Sapporo Natural History Society (札幌博物學會報)

Abstracts Nos. 1-146

(Referring mostly to the principal papers in Botany and allied subjects which have appeared in Japan during July–December, 1939)

1. Mitosen im Sporogonium von *Laminaria japonica* ARESCH. Kôgorô ABE. (Sc. Rpts., T.I.U. **14**, 1939, 327–329, 2 Taf.).

Der Verf. hat die Kernteilung und Sporenbildung im unilokulären Sporangium von *Laminaria japonica* untersucht. Er hat verschiedene Stadien der Kernteilung verfolgen können, nämlich Synapsis, Spirem und Diakinese. Die bivalenten Chromosomen betragen ungefähr 22. In der Metaphase dieser Kernteilung sowie in der nachfolgenden homöotypischen Kernteilung hat er die zentrosomähnlichen Körperchen an einem oder zwei Polen der Spindel nachgewiesen. Die nach der homöotypischen Kernteilung entstandenen vier Zellkerne erfahren weitere Teilungen, um nach der fünften Teilung 32 freie Kerne entstehen zu lassen. Nun folgt die freie Zellbildung, um damit 32 Sporen zu produzieren. Obgleich der Verf. nicht die haploide Chromosomenzahl feststellen konnte, ist er von der Ansicht, dass die zwei ersten Kernteilungen im unilokulären Sporangium die Reduktionsteilung darstellen und dass somit *Laminaria japonica* einen regelmässigen Generationswechsel zwischen der geschlechtlichen und ungeschlechtlichen Generation zeigt.

2. On the pathological histology of hypertrophied leaves of *Camellia Sasanqua* caused by *Exobasidium Camelliae* var. *gracilis*. (Japanese with English résumé). Shigeyasu AKAI. (A.PP.S.J. **9**, 1939, 61-68, 1 pl. and 2 text-figs.).

The hymenium of *Exobasidium Camelliae* is usually developed in the intercellular space of mesophyll cells under the lower epidermis of leaves. The overlying tissue ruptures in consequence and remains as a membranaceous piece attached to the leaf-margin. Through hypertrophy as well as hyperplasia the regular arrangement of mesorphyll cells is disturbed, which is partially due to the action of osmotic pressure. Some endings of the vascular bundle extend towards the hymenium, which will serve for supplying the nutrients from the host to the causal fungus.

3. On the pathological anatomy of hypertrophied shoots of *Xolisma elliptica* caused by *Exobasidium Pieridis*. (Japanese with English résumé). Shigeyasu AKAI. (J. Jap. B. **15**, 1939, 484-488, 4 text-figs.).

Both hypertrophy and hyperplasia occur in the deformed lamina, petiole and stem of *Xolisma elliptica* affected by *Exobasidium Pieridis*. The hyphae and haustoria of this fungus are found in all affected parts. The mycelium develops at first under the epidermis or in the intercellular space of the subepidermal cell layer. The basidia take their origin in this mycelial tissue, and reaches the cuticle through the middle lamella of radial walls of the epidermis, the cuticle breaks down, and the basidia are exposed externally.

4. On the ash figures of leaves of the rice plant transplanted from different kinds of nursery-beds and their susceptibilities to the blast disease. (Japanese with English résumé). Shigeyasu AKAI. (A.PP.S.J. **9**, 1939, 223-235, 14 tables).

As well known, the rice seedlings are at first cultivated in special nursery-beds and after they have grown to a certain extent, they are transplanted to proper fields.

According to the author the susceptibility of such rice plants to blast disease seems to depend on the nature of nursery-beds: it was observed that the seedlings cultivated in humid ones are more resistant against the blast disease than those reared in arid ones. The author's study of ash figures of the leaves of seedlings from both kinds of nursery-beds has shown that in those reared in humid beds the number of silicated epidermal cells, especially the silicated guard-cells of stomata per unit area is much greater than in those from arid beds. Since the guard-cells are most easily penetrated by the causal fungus of the blast disease, the above observation will account for the less susceptibility of plants derived from the seedlings reared in humid beds.

5. Physiological studies on the susceptibility of paddy rice to the blast disease. (Preliminary note). (Japanese). Sinzirô AKIMOTO. (P.C.S.S.J. **11,** 1939, 165–167).

The author has studied by means of water as well as field-culture the relationship existing between the susceptibility of paddy rice to the blast disease and the concentration of the culture medium incl. the silicates.

The high concentration of the culture medium leads to the intensification of the susceptibility to the blast disease, while the higher the dosis of the silicates given, the lower the susceptibility. The ratio $\frac{SiO_2}{N}$ of these two substances absorbed by the plant is various, and the greater this ratio, the greater the degree of silicification of leaves, the smaller the susceptibility to the blast disease of leaves and panicle-necks.

6. Varietal differences in panicle development of rice with reference to early or late transplanting. (Japanese with English résumé). Sinzirô AKIMOTO and Yosio TOGARI. (P.C.C.S.J. **11,** 1939, 1–17, 13 pls.).

The rice seedlings which have grown up in the nursery beds during the same number of days from the sowing (30 days), were transplanted into paddy fields at three different dates, viz. June 15th and 30th, and July 15th. The authors have studied the influence of such different treatments on the number of days extending from the transplanting to the heading in early or late maturing varieties respectively.

The period between the transplanting and the heading is distinguished by the authors into two subperiods, viz. the first is the time from the transplanting till the beginning of the differentiation of the panicle, as marked by the formation of its first bract, and the second is that of the further differentiation of the panicle till the heading time.

The experimental results are summarized as follows:

The first subperiod above mentioned is either short or long in early and late varieties respectively. By late transplanting the duration of the first subperiod becomes more shortened in late varieties than in early ones. The second subperiod is shorter in early than in late or median varieties, though the difference between them is slight. Almost no influence of the late transplanting is observable in early varieties, but in median or late ones it shortens the second subperiod, and the later the transplanting, the shorter that duration.

Basing on the results of numerous experiments the authors come to the conclusion that by late transplanting the time intervall between it and the heading becomes much more shortened in median or late than in early varieties, and that this is chiefly due to the shortening of the first subperiod above stated.

7. On the systematic anatomy of the leaves of some Japanese carices XXII–XXVII. (Japanese with English résumé). Shigeo AKIYAMA. (B.M.T. **53,** 1939, 302–307, 3 text-figs.; 339–345, 4 text-figs.; 400–405, 4 text-figs.; 443–448, 4 text-figs.; 489–494, 4 text-figs.; 534–540, 3 text-figs.).

The anatomical structure of leaves of the several species of *Carex* is described in detail with illustrations, and a comparison between them is made. The purely descriptive character of the papers makes it impossible to make the short comprehensible abstract, and here simply the names of the species examined by the author will be enumerated, viz. *Carex tristachya, oshimensis, okushirensis, albata, arenicola, cyperoides, diandra, disperma, fallax* (var. *Franchetiana*), *gibba, leiorhyncha, loliacea, Maackii, neurocarpa, omiana, planata, pseudo-loliacea, remotiuscula, Rochebruni, stipata, tenuifolia*.

8. Mikrochemischer Nachweis der Flechtenstoffe. X. Mitteilung. Spezieller Teil (Fortsetzung). Yasuhiko ASAHINA. (J. Jap. B. **15,** 1939, 465–472, 1 Taf. u. 2 Textfig.).

Die Didymsäure wurde in amerikanischer *Cladonia didyma, Cl. cristatella, Cl. lepotrina* sowie in vielen Arten der Cocciferae, weiter in japanischen Exemplaren von *Cl. Floerkiana* und *Cl. bacillaris* nachgewiesen. Die Extraktion und die Eigenschaften dieser Säure sind ausführlich beschrieben in der Zusammenarbeit mit H. MIZUO.

Die Identität der Didymsäure mit der ZOPFschen Incrassatsäure wird betont. Der Verf. hat bei gewissen Exemplaren von *Cl. incrassata* nicht nur die Usninsäure und die Squamatsaüre, sondern auch die Didymsäure nachweisen können. Ein japanisches Exemplar von *Cl. Grayii* MERILL f. *squamulosa* SANDST. wurde die Chlorophaensäure sehr reichlich zu enthalten beobachtet. Ihre Extraktion wurde zusammen mit Z. SIMOSATO ausgeführt.

Aus *Cl. strepsillis* (ACH.) WAIN. wurde das Strepsilin extrahiert (zusammen mit M. YASUE). Die einfachste berechnete Formel ist $C_{15}H_{12}O_{5}$, wobei die Molekulargewicht noch nicht bestimmt wird.

9. Japanische Arten der Cocciferae (*Cladonia-Cenomyce*). (Deutsch, japanisch m. latein. Diagnosen). Yasuhiko ASAHINA. (J. Jap. B. **15,** 1939, 602-620, 663-671, 2 Taf. u. 3 Textfig.).

Die wichtigsten Stoffwechselprodukte der Cocciferae sind die Usninsäure, Squamatsäure, Barkatinsäure, Thamnolsäure, Didymsäure, das Zeorin und Bellidiflorin. Es kommt oft vor, dass die eine oder andere der obengenannten Substanzen je nach verschiedenen Individuen derselben Art nicht nachweisbar sind, oder immer vorhanden sind. Die Produktion solcher sog. akzessorischen Bestandteile scheint von den äusseren Bedingungen abhängig zu sein, z.B. Substrat oder zufällig eingedrungene Gonidien.

Das Vorkommen oder Nicht-Vorkommen der obengenannten Substanzen als eigentlicher oder akzessorischer Bestandteile in verschiedenen Arten oder Varietäten der japanischen Cocciferae wird tabellarisch dargestellt.

Im speziellen Teile sind die folgenden genau beschrieben, mit morphologischer sowie chemischer Berücksichtigung, nämlich, *Cladonia pleurota* (FLK.) SCHAER., var. *hygrophila* ASAHINA var. nov., f. *frondescens* (NYL.) ASAHINA comb. nov., *Cl. crenulata* FLK. emend. ASAHINA, *Cl. gonecha* (ACH.) ASAHINA comb. nov., *Cl. incrassata* FLK., *Cl. granulata* WAIN., f. *leucocarpa* ASAHINA f. nov., *Cl. metacorallifera* ASAHINA sp. nov., f. *squamosa* ASAHINA f. nov., f. *tingens* ASAHINA f. nov., var. *reagens* ASAHINA var. nov., *Cl. transcendens* WAIN., *Cl. bellidiflora* (ACH.) SCHAER., f. *tubaeformis* (WALLER) WAIN., *Cl. graciliformis* ZAHLBR., *Cl. theiophila* ASAHINA sp. nov., *Cl. Floerkeana* (FR.) SOMMERT., var. *suboceanica* ASAHINA var. nov., var. *alpina* ASAHINA var. nov., f. *tingens* ASAHINA f. nov., *Cl. bacillaris* NYL. var. *pacifica* ASAHINA var. nov., f. *tingens* ASAHINA f. nov., *Cl. pseudodidyma* ASAHINA sp. nov., var. *subpygmaea* var.

nov. ASAHINA, *Cl. macilenta* (HOFFM.) NYL. var. *ostraeta* NYL., *Cl. digitata* SCHAER., *Cl. polydactyla* FLOERKE, var. *perplexans* ASAHINA var. nov.

10, Researches on the mulberry virosis II. (Japanese with English résumé). Yasutarô ENDÔ. (B.S.S. **11**, 1939, 203–218, 5 text-figs.).

Concerning the virosis of mulberry trees prevalent in different provinces of Japan, the author has shown that the virus in expressed juice of leaves of the trees suffering from this disease has the power of discolouring the methylen blue solution, owing to its reducing action, so that the virus-diseased leaves can be easily distinguished from the healthy ones which lack such reducing power. The grafting experiments with diseased buds on healthy stocks have proven that the virus can be transmitted to the latter by this means. Seedlings derived from diseased mulberry plants have shown a variety of malformations, for instance, the cotyledons are deformed to become filiform, or leaves are chlorotic or mosaic (green-chlorotic). Malformations may amount almost as much as 25% of the whole. The virus may remain long alive in dessicated leaves, so, for instance, the author has observed that the reducing action of methylen blue is still present in leaves preserved dry during nine years.

11. A comparative study of the influence of various light and soil moisture condition upon the germination of seeds and the growth of seedlings of *Pinus densiflora* and *Chaemacyparis obtusa* (Japanese with English résumé). Sinkei GEN. (B.S., F.T., K.I.U. **7**, 1937, 373–405, 1 pl.).

By means of certain experimental arrangement seeds and seedlings of *Pinus densiflora* and *Chamaecyparis obtusa* were exposed to four different grades of light, viz. intensely bright, weakly bright, very weakly bright and dark, and to three different moisture conditions, viz. moist, moderately moist and dry. The germination of seeds and the growth of seedlings were compartively studied. The results are summarized as follows:

In respect to seed germination the adaptability to intense light and to lack of moisture is found greater in *Pinus densiflora* than in *Chamaecyparis obtusa*, while the ability to endure the great moisture is found to be greater in the latter than in the former. The comparative studies of the elongation rate of seedlings as well as the growth of aerial and subterranean parts under different light and moisture conditions above pointed out have led the author to the conclusion that the adaptability to intense light and lack of soil moisture seems to be greater in *Pinus* than in *Chamaecyparis*. The comparative study of the structure of primary leaves developed under various different conditions above indicated has led to the conclusion that *Pinus* is much more influenced by light intensity than *Chamaecyparis*, while in respect to the influence of moisture no appreciable differences are observed between the two.

Basing on all facts observed the author sums up his experimental results as follows: *Pinus densiflora* is light-loving and drought-resistant, while *Chamaecyparis obtusa* is shade-loving and moisture- resistant.

12. Pollen studies of sugar-cane I. Pollen germination in culture media 1. (Japanese with English résumé). A. GONDO and M. TAKAHASHI. (J.J.G. **15**, 1939, 194–208, 7 text-figs.).

The germination of pollen of certain strains of sugar-cane was experimented upon by the authors at the temperature 25°. It was found that the addition of boric acid to the nutrient medium (agar+sugar) increases the germination rate, and its $3\times10^{-5}\%$

is most effective (43% versus 36% in the control). At the same time the bursting of pollen was shown to diminish by this treatment (24% versus 31% in the control). The use of artificial nutrient medium containing 7/10 mol. sucrose and 0.5% agar has given the highest germination rate and the lowest bursting rate. The concentration of sucrose just indicated has its osmotic value nearly equal to that of stigmatic cells. The pH-value of the nutrient medium most favourable for the pollen germination lies between 5.2–6.4. Under pH 5.2 and above 6.4 that rate is lowered considerably. For the growth of pollen tube the pH-value somewhat higher than that for germination is most favourable.

13. A note on staminoidy in *Trillium amabile* MIYABE et TATEWAKI. (With Japanese résumé). Tutomu HAGA. (J.J.G. **15,** 1939, 230–240, 3 text-figs., 5 tables).

The metamorphosis of petals into stamens, either wholly or partially, is very frequently observed in flowers of *Trillium amabile.* The frequency is very high, thus, for instance, 40.4%. One and the same individual bears normal flowers in one year, and abnormal ones in another, so that this abnormality is not at all hereditary. The frequency of abnormality is in flowers on twin shoots higher than in those on single shoots, e.g. 56% against 31.4%.

14. A gene "stiff" and the genes linked with it in *Pharbitis Nil.* Tokio HAGIWARA. (J.J.G., **15,** 1939, 281–286, 8 tables).

Flowers of the strain "Suzigane" are unable to open by themselves on account of the excessive rigidity of vascular bundles in the corolla; the gene "stiff" (s_t) is responsible for it. Other genes cited in this article are: c_t contracted, s_r side-reduced, igl interaxial green, p_r belonging probably to the contracted linkage group according to IMAI.

On the basis of the genetical studies of linkage relationship existing among the above cited genes, the author concludes that they are arranged on the contracted chromosome in the order igl–c_t–s_t–s_r–p_r.

15. Two new genes of the yellow linkage group in *Pharbitis Nil.* (Japanese). Tokio HAGIWARA. (B.Z. **7,** 1939, 1199-1203).—**A linkage between purple and white flower in *Pharbitis Nil.*** (With Japanese résumé). By the same author. (B.M.T. **53,** 1939, 296-301, 328).—**Genetic studies of flower colours in Japanese morning glory IX. A new gene "dun" for dull-coloured flowers.** By the same author. (Ibid, **53,** 1939, 351–356).

A number of new genes in *Pharbitis Nil* were discovered and their respective linkage values determined.

16. Species crosses between *Solanum integrifolium* POIR. and *S. Melongena* L. and abnormal individuals which have appeared in their F_2 generation. (Japanese). Tokio HAGIWARA and Hideo IIDA. (B.Z. **7,** 1939, 1520–1528, 3 text-figs.).

In F_2 generation of the cross of *Solanum* species pointed out in the above title dwarfs, as well as individuals of various fruit-colours (yellow with or without furrows, etc.) were produced. *S. integrifolium* × white fruited egg plant F_1 is characterized by its intense heterosis as compared to that of the cross *S. integrifolium* × black-fruited egg plant; it is somewhat sterile, though not completely, and its seeds are larger than those of either parent.

Basing on the results of various crossing experiments the authors have determined the factorial composition of various strains.

17. Physiologisch-morphologische Studien über *Armillaria mellea* (VAHL.) QUÉL. mit besonderer Rücksicht auf die Oxalsäurebildung. Ein Nachtrag zur Mykorrhiza von *Galeola septentrionalis* REICH. f. Minoru HAMADA. (Jap. J. B. **10,** 1940, 387-463, 1 Taf. und 15 Textfig.).

18. Investigat on on the development and the property of the wax and fat-like substances in the fruit of the *Rhus* plants found in Japan. (Japanese with English résumé). Morisige HARADA. (B.S., F.T., K.I.U. **8,** 1939, 326-342, 1 pl.).

Of a number of the Japanese *Rhus* plants studied by the author the wax cells are found in the mesocarp of fruits in *R. succedanea, silvestris, vernicifera, trichocarpa* and *Toxicodendron* var. *vulgaris*, while in *R. semialata* var. *Osbeckii* the wax crust is seen developed on the epicarp.

When the development of wax in wax cells is traced, a number of small wax grains at first appear on the inner side of the cell-wall; they gradually increase, until a massive wax is formed within the cell. In some species the wax does not increase very much, while in others a compact glassy wax mass is formed, and is traversed by the pore-canals which run from the center towards the periphery. The wax crust formed on the epicarp of *Rhus semialata* var. *Osbeckii* is produced by the oozing out of the contents in the trichomes, and on the more illuminated side of the fruit the development of wax crust is much more conspicuous than on the shade side.

19. Ueber die Temperaturmessungen mit Thermoelementen im Freien. (Japanisch). Isao HATAKEYAMA. (B.Z. **7,** 1939, 1359–1366 u. 1539–1546, 10 Abb.).

I. Der Verfasser verwendet für Herstellung des zur ökologischen Temperaturmessung geeigneten Thermoelementes 8 Kupfer- und 16 Konstantandrähte von 0.17 mm Durchmesser, von welchen jeder, zusammengedreht, eine Länge von 7 m zwischen der Kontrollötstelle und der Handhabe der Messlötstelle beträgt. Je ein aus dem Leitungsdrähte herausgezogener Draht wird zusammengelötet.

Vier Typen von Lötstelle wurden zum Vergleich gezogen.

a) Thermo-Fäden. Die Drähte wurden in einem spitzen Winkel miteinander gelötet und besitzen bis zur Handhabe keine Hülle.

b) Thermo-Bleche. Die Spitzen der beiden Drähten wurden zu kleinen Blechen abgeplattet und in einer Ebene gelötet. Die Lötlinie liegt hier in der Mitte der kleinen Fläche, 0.08 mm dick, 0.28 mm breit und 2 cm lang.

c) Thermo-Nadel. Diese besteht aus einem Kupferzylinder (9 cm lang, 0.3 mm dick und 0.7 mm im Innendurchmesser) und einem Konstantandraht im demselben.

d) Thermo-Stäbchen. Die Messlötstelle wurde in einem an der Spitze verjüngten Glaszylinder von 0.8 cm Durchmesser und 40 cm Länge eingeschlossen, dessen verjüngte Spitze einen Durchmesser von 0.3 cm und eine Länge von 1 cm besitzt.

II. Da bei der Temperaturmessung mittels eines Thermoelementes die Wärmeleitung durch die Elementendrähte (oder Nadel, usw.) von oder zu der Lötstelle Fehlerquelle ausmacht, wurde zuerst die Temperaturerhöhung der Messlötstelle durch Wärmezufuhr untersucht, indem verschiedene Länge der Elementendrähte ins Messobjekt eingestochen und der frei bleibende Teil derselben verschieden stark erwärmt wurde.

a) Wenn dic Spitze der Thermonadel 6 cm lang in den Luftraum der Thermosflasche von 28.9°C eingetaucht ist und der hintere Teil bis zu 35.2°C erwärmt wird, so beträgt die Übertemperatur der Lötstelle 3.1°C über 28.9°C. Wenn die Nadel 2.4 cm lang im Wasser von 27.6°C eingetaucht ist, erfährt die Lötstelle keine Temperaturerhöhung, wenn der Aussenteil auch bis zu 35.5°C erwärmt wird. Gleichfalls, um bei

der Banane den Temperaturunterschied von 6.4°C zwischen der Frucht und der Luft unwirksam zu machen, muss man die Nadel 37 mm lang einstechen.

b) Bei der Lufttemperatur-Messung mittelst der Thermofäden wirkt der Temperaturunterschied von 6.6°C zwischen den Messungs- und Leitungsfäden nicht verwirrend ein, wenn die Spitze 6 cm lang in der isothermischen Luftmasse eingetaucht ist. Um im Wasser den Temperaturunterschied von 8.5°C unwirksam zu machen, braucht man die Fäden nur 9 mm lang einzutauchen. Einsteckung der Fäden 12 mm lang in der Banane ist erforderlich, um den Temperaturunterschied von 10.8°C unwirksam zu machen. Bei der Oberflächentemperatur-Messung des *Nuphar*-Blattes ist die innige Berührung der Fäden 32 mm lang mit der Blattfläche erforderlich, um die durch Temperaturunterschied von 9.1°C verursachte Wärmeleitung zu der Lötstelle selbst fernzuhalten.

Aus dem oben erwähnten geht hervor, dass als Messgeräte die Thermofäden die Thermonadel übertreffen, zumal bei der Messung der Innentemperaturen des Pflanzenkörpers.

c) Bei der Oberflächentemperatur-Messung des *Oryza*-Blattes mittelst der Thermobleche, die in einem spitzen Winkel wie die Thermofäden gelötet sind, ist die innige Berührung der Bleche 12 mm lang erforderlich, um den Temperaturunterschied von 5.5°C unwirksam zu machen.

III. Da das Volum der Luft, welches der Wärmekapazität der Lötstelle und der 6 cm langen Leitungsfäden der Thermofäden entspricht, nur 8.3 cm^3 beträgt, so ist die Lufttemperatur-Messung im inneren Raum der Blütenknospe von *Nelumbo nucifera*, wegen der grossen Dimensionen (6 cm im Durchmesser), unabhängig von der Aussentemperatur durchführbar.

Für die Temperaturmessung im Wasser und Erdboden ist auch das Thermostäbchen verwendbar, bei der genaueren Messung der Temperaturverteilungen sind aber die Nadel- oder Fädenelemente in wagerechter Stellung zuverlässig.

Bei der Lufttemperatur-Messung ist die Strahlungseinwirkung desto geringer, je dünner die Thermofäden sind. Zum Strahlungsschutz ist dabei das Tuch zu empfehlen, da die Übertemperierung desselben über der Aussenluft im Vergleich mit anderen Hüllen (Metall-, Holzplatte u. dgl.) sehr gering ist.

Weil die Strahlungsdurchlässigkeit des dünnen Blattes nicht gering ist (bei einem *Oryza*-Blatte, 10.2%), so kann die Strahlungseinwirkung auf die Blattemperatur-Messung auch an der Schattenseite möglich sein. Um diesem Mangel abzuhelfen, sind die Thermobleche anzuwenden, die eine schmale Breite und eine wenige Wärmekapazität im Vergleich mit der Berührungsfläche haben. Verf.

20. On the effect of electricity upon the growth of wood-destroying fungi. (Japanese with English résumé). Teiiti HATTORI and Takasi TAMURA. (A.PP.S.J. **9**, 1939, 211–222, 7 text-figs.).

Poria vaporaria (PERS.) FR., *Polystictus sanguineus* (L.) FR. and *Schizophyllum commune* FR. were the materials for the experiments of the checking effect of electric current on the growth of the wood-destroying fungi. Electric current was direct, alternating, or of high frequency. Fungi were cultured on certain culture media or on a piece of wood. It was shown firstly, that the fungi are destroyed at the spot where the density of electric current is great, secondly, that direct current is more effective than the alternating, and thirdly that high frequency current is not to be expected to be greatly effective. Various causes for the checking effect were considered,

and it was concluded that the electro-endosmose will contribute principally to the checking action.

21. On the relation of air humidity to conidia formation in the rice blast fungus, *Piricularia Oryzae*, and the characteristics in the germination of conidia produced by the strains showing different pathogenicity. (Japanese with English résumé). Takewo HEMMI and Junzo IMURA. (A.PP.S.J. **9,** 1939, 147–156).

Rice seedlings about 20 cm high sprayed with the conidia suspension of *Piricularia Oryzæ* were placed within a large dessicator, and the humidity within it was kept variously by the use of different salts or sulphuric acid in several concentrations. These experiments have shown that the conidia are not produced at 88% or lower relative humidity, scarcely at 89–90%, and may be produced above 93% or more.

The percentage of the conidia germination as well as the length of germ-tubes are not correlated with the degree of pathogenicity of different strains. The tendency of the production of the two germ-tubes from one single conidium was observed, and the more intense the pathogenicity, the more frequent was this tendency.

22. Pathological studies on *Polyporus rhodophaeus* LÉV. (Japanese with English résumé). Takewo HEMMI and Shigeyasu AKAI. (A.PP.S.J. **9,** 1939, 199-210, 1 pl.).

Polyporus rhodophaeus LÉV. often called *P. semilaccatus* BERK, is known to be parasitic on various broad-leaved trees. In Japan it is often found parasitic on cherry trees, and according to the authors *Robinia pseudo-acacia* is very susceptible to its attack. When this tree is attacked by this fungus, its sap-wood generally begins to decay at first to cause the peripheral rot, but sometimes the heart-wood is attacked, and then the peripheral part of wood remains sound. The rotted wood becomes soft, light, and uniformly whitish. The relation of the fungal growth to the temperature was studied by culturing it on certain agar media, and it was shown that though the mycelial growth may take place between 10–40°, the temperature between 31–32° is especially favourable for it. The observations of rotten wood as well as the BAVENDAMM's reaction show that this fungus belongs to the so-called "Korrosionspilz."

23. Studies on the *Phytophthora* rot of egg plants on the market. (Japanese with English résumé). Takewo HEMMI and Seitaro NAKANISHI. (A.PP.S.J. **9,** 1939, 157–169).

The *Phytophthora* rot of egg plants, often seen in the market of Kyôto, etc. is caused by *Phytophthora melongeneae* SAWADA which may be identical to *P. parasitica* BUTLER.

As regards the relation of this fungus to the temperature it was shown that the growth of its culture takes place between 10–36°, optimum 28–32°; at 30° on one hand and 40° on the other no growth occurs. Decay of infected fruits takes place most intensely at ±28°; at 5–6° no infection occurs, even by wound inoculation. pH for the mycelial growth ±6.0, at pH 3.0 and 8.5 no growth is perceptible. In the relative humidity up 95% the aerial mycelium of the fungus grows most vigorously, while the conidia formation takes place more abundantly at 85% or lower relative humidity.

The author has proven that the artificial inoculation is successful even in the case of unwounded fruits as well as young seedlings. Tomato and red pepper may be infected by this fungus.

24. Respiration of leaves after sunset. (Japanese). Keinosuke HIRAMATU. (E.R. **5,** 1939, 313–315).

The intensity of respiration after sunset, for instance, 8–9 o'clock afternoon, was measured in respect to some plants, viz. *Daphniphyllum humilis, Ilex Sugeroki* subsp. *brevipedunculata, Sasa kurilensis, Acer Tschoonosikii.* It was found that the respiration intensity was somewhat greater in good than in cloudy weather. Furthermore, no correlation seems to exist between the respiration intensity and the assimilation quantity in the day time.

25. Miscellaneous notes on the East Asiatic Uredinales with special reference to the Japanese species. (V)-(VI). (With Japanese résumé). Naohide HIRATSUKA. (J. Jap. B. **15,** 1939, 433-439, 621–627, 2 text-figs.).

The following new species are described among others: *Puccinia Makiana, P. toyohirensis, P. nasuensis.*

26. Considerations on the transport of mosaic disease of tobacco. (Japanese). Shigekatsu HIRAYAMA. (P.J.S.A.S. **14,** 1939, 150–153).

Though it is well known that the infection of virus disease of tobacco takes place through wounded parts of stems and leaves, our knowledge concerning the mode of infection seems to be very poor. The author's experiments contained in this article are concerned with the latter subject.

The experiments concerning the question, whether or not the infection of the virus will take place through seeds have given the negative results. The author has performed besides the self-pollination of diseased stocks the crossing, diseased × healthy in both reciprocal ways as well as diseased × diseased. The offspring therefrom were quite healthy with one single exception. The reason of this negative result seems to be comprehensible on the basis of the following experimental results. Powdered seeds or seedlings of healthy plants with the addition of water are mixed up with the sap pressed out from diseased leaves, and healthy plants were brushed with this mixture, either immediately since its preparation or after one day. The effect of this procedure was studied by comparing its behaviour with that of the control (i.e. healthy plants brushed with sap of diseased leaves without any addition). It is then seen that in the former case the effect of infection is far feebler when healthy leaves were brushed with the mixture above pointed out after one day than immediately since its preparation, while in the control no such difference is perceptible. On the basis of such experiments the author thinks that seeds and especially seedlings of healthy plants will contain certain substances which will annihilate the possibility of the virus infection, whence the non-infection through seeds.

Furthermore, to know whether the virus infection will take place in the soil, the author has cultivated some healthy stocks on the soil mixed up with pieces of diseased leaves. He has seen however that the plants have grown up quite healthily, whence he concludes that the soil infection will not be possible unless the roots of the host are in heavily damaged condition.

Larvae of insects which are provided with masticatory mouth, as, for instance, *Chloridea assulta*, might execute the virus infection. The author has taken up such larvae living on diseased plants, and placed them on leaves of healthy ones. In this operation the same larvae were placed each day on new healthy plants, and their infective ability was examined. It was seen that the larvae taken directly from diseased plants are able to execute the infection, though only in a very few cases, but that the same larvae once laid on healthy plants will lose their ability of infection.

27. Variations of the flowering time in some varieties of the wild barnyard grasses (*Echinochloa Crusta-galli* BEAUV.) distributed in different latitudes. (Japanese). Isao HIRAYOSHI. (J.J.G. **15**, 1939, 331–332).

Echinochloa Crusta-galli subsp. *edulis* HONDA is a plant universally cultivated in Japan. The author has got recently from various parts of China situated in different latitudes seeds of wild barnyard, *Echinochloa Crusta-galli*, which is the origin of the latter. Such seeds were sown, and the time lying between their germination and flowering was observed. It was confirmed that the higher the latitude, where each individual is growing, the shorter that time duration, which is just the same as in the rice and other cultivated plants. Thus, for instance, Peking 39° 54′...66.10 days (average), Nanking 32° 4′...79.66 days (average).

28. Untersuchungen über die Lage des Kompensationspunktes der Wasserpflanzen in Kizakisee. (M. japan. Zfg.). Kinji HOGETSU. (B.M.T. **53**, 1939, 428–442, 3 Textfig., 466–467).

Um die vertikale Verbreitung der Wasserpflanzen im Kizakisee aufzuklären, führt der Verf. die Untersuchungen über die Assimilationsleistung und die Messungen der Aussenfaktoren während des Sommers und des Spätherbstes des Jahres 1937 aus. Als Versuchspflanzen dienten dabei *Hydrilla verticillata* var.*Roxburghii*, *Myriophyllum spicatum*, *Ceratophyllum demersum*, *Ranunculus aquatilis* var. *flaccidus* f. *Drouetii* und *Nitella* sp. Im Sommerversuche über Assimilation lag der Kompensationspunkt bei *Hydrilla* in einer Tiefe von etwa 8–13 m, bei *Myriophyllum* 8 m, bei *Ceratophyllum* 9–15 m und bei *Nitella* 7–16 m, dagegen im Spätherbst, bei *Myriophyllum* in 7–11 m Tiefe, bei *Ceratophyllum* in 5–7 m, bei *Ranunculus* in 4–5 m und bei *Nitella* in 9–13 m. Die Kompensationspunkte lagen im Spätherst trotz sehr schwachen Lichtes beinahe in gleicher Tiefe wie bei dem Sommerversuche. Auf Grund der Versuche über die Assimilationsleistung in verschiedenen Tiefen teilte Verf. die Versuchspflanzen in folgende Gruppen ein: (1) *Ranunculus*-Typus (hellstenophotisch), (2) *Hydrilla*-Typus (euryphotisch), (3) *Nitella*-Typus (dunkelstenophotisch). S. KINOSHITA

29. Nuntia ad floram japoniae XXXIX–XL. (With Japanese résumé). Masazi HONDA. (B.M.T. **53**, 1939, 333–334, 357, 383–386, 421).

The following new species, etc. are described:

Vicia austro-higoensis sp. nov., forma *linearifolia* f. nov., forma *brachyceras* f. nov., *Thalictrum nippono-alpinum* nom. nov., *Rhododendron decandrum* MAKINO var. *albiflorum* HONDA var. nov., *R. Inobeanum* sp. nov., *Persicaria anguillans* comb. nov., var. *brevifolia* comb. nov., var. *tomentosa* comb. nov., forma *pilosa* comb. nov., forma *virid-alba* comb. nov., var. *subintegra* var. nov., *Elaeagnus pungens* var. *rotundifolia*, *Imperata praecoquis* sp. nov., var. *audicarpum* var. nov.

30. Contributions to the knowledge of the systematics of *Morus* in Japan XV–XVII. *Morus* in cultivation X-XII. Teikichi HOTTA. (B.M.T. **53**, 1939, 292-296, 327-328, 335–338, 358, 386–391, 422).

In the first of the three papers cited in the above title 5 new varieties and 2 new forms of *Morus bombycis* KOIDZ., 2 new varieties and 2 new forms of *M. latifolia* POIRET are contained. In the second paper 2 new varieties and 3 forms of *M. bombycis* are cited, and in the third 13 new varieties and 7 forms of *M. bombycis*, 1 new var. and 4 new forms of *M. latifolia*, 1 new var. and 1 new form of *M. alba* are cited.

In all 70 cultivated species of *M. bombycis*, 39 of *M. latifolia*, 31 of *M. alba* are duly established by the author.

31. Studia agaricacearum japonicarum I. (With Japanese résumé). Sanshi IMAI. (B.M T. **53,** 1939, 392–399, 422).

The following new species are described among others: *Amanita rubrovolvata, Pleurotus pulchellus, Hygrophorus (Camarophyllus) fuscovillosus, H. chrysoconos.*

32. Observations on Japanese fungi. (II) Polyporaceae. (III) Some hard and perennial stereums in Japan. (Japanese with English résumé). Rokuya IMAZEKI. (J. Jap. B. **15,** 1939, 440–449, 7 text-figs., 578–588, 8 text-figs.).

The following species are described and illustrated: *Polyporus squalens* (KARSTEN) SACCARDO, *P. guttulatus* PECK. apud SACCARDO, *P. montanus* (QUELET) BRESDOLA, *Trametes subrosea* WEIR., *T. malicola* BERKELEY, *T. flavescens* BRESADOLA, *Stereum princeps* JUNGHUHN, *S. subpileatum* BERKELEY et CURTIS, *S. hirgense* IMAZEKI sp. nov., *S. sapium* BURT., *S. sulcatum* BURT, *S. annosum* BERKELEY et BROOME, *S. frustulosum* PERSOON, *S. nigrosum* FRIES, *S. induratum* BERKELEY (doubtful).

33. Studia lichenum japoniae I. Sunao INUMARU. (A.PT.G. **8,** 1939, 223–227, 2 text-figs.).

Nephroma sordide-luteum is a new species. Besides 6 other species of *Nephroma* are enumerated.

34. Lichen novus hawaiensis faurieanus. Sunao INUMARU. (A.PT.G. **8,** 1939, 227–228, 6 text-figs.)

One new species, *Nephroma tomentellum* which was collected by FAURIE in Hawaii in 1909 is described.

35. Studies of plant communities on barefaced cliffs. (Japanese with English résumé). E. IWATA. (E. R. **5,** 1939, 131–145, 218–234, 16 text-figs.).

The author has followed up the development of vegetation in the barefaced cliffs, either artificial or natural near Sendai. The plants will come to development, when the inclination of cliff is less than 45°. The primary plant community on such cliff is either *Petasites japonicus—Equisetum arvense* or *Rubus microphyllus* var. *incisum.* The former community will come on the cliff with some accumulation of soil on its surface, while the latter will develop on very inclined slopes with no soil accumulation. It is to be remarked that the latter community is very often replaced by the former, especially when some accumulation of soil will come up. The secondary community is made up of *Miscanthus sinensis,* which follows the two primary communities above indicated. Though this community is principally constituted of *Miscanthus sinensis,* it contains besides *Artemisia vulgaris* var. *indica, Ixeris dentata, Pleioblastus Chino,* etc. and also some plants of the primary communities (*Petasites, Rubus, Equisetum*), and at a later stage some other plants.

In a certain spot on the suburb of Sendai the author has followed comparatively during six years the development of plant communities on the slopes and the horizontal surfaces, and he could not observe any essential difference between the two in respect to this phenomenon.

36. Studies on chromosome structure I. Spiral structure of chromosomes in *Trillium Smallii* MAXIM. Jiro IWATA. (Jap. J. B. **10,** 1940, 365–373, 2 pls.).

37. Studies on chromosome structure II. The attachment chromomeres in the meiotic chromosomes. Jiro IWATA. (Jap. J. B. **10,** 1940, 375–382, 1 pl. and 4 text-figs.).

38. Contributions to the bryological flora of the Island Kaibato. (Todomosiri). (Japanese). Minoru KAMIMURA. **(J. Jap. B. 15, 1939, 727–734, 2 text-figs.).**

Kaibato Isl. lying to the west of principal Sachalien Isl., is situated at 141° 12′ 5″– 141° 13′ 5″ E.L., 46° 13′ 5″ –46° 15′ 5″ N.L. The following species of Bryophytes are enumerated as observed in this island:

Hepaticae.—*Plagiochasma* (1 sp.), *Conocephalus* (2), *Marchantia* (1), *Pellia* (2), *Blasia* (1), *Chiloscyphus* (1), *Cephalozia* (1), *Diplophyllum* (1), *Madotheca* (1), *Frullania* (1).

Musci.—*Fissidens* (2), *Ceratodon* (1), *Bryoxiphyum* (1), *Trematodon* (1), *Dicranella* (1), *Discranum* (1), *Weisia* (1), *Grimmia* (1), *Funaria* (1), *Bryum* (2), *Mnium* (4), *Bartramia* (1), *Philonotis* (1), *Climacium* (1), *Neckeria* (1), *Thamnium* (2), *Abietinella* (1), *Cratoneurum* (2), *Brachythecium* (3), *Bryhnia* (1), *Myurocladia* (1), *Scleropodium* (1), *Plagiothecium* (1), *Breidleria* (1), *Rhytidium* (1), *Rhytidiadelphus* (2), *Batharinaea* (1), *Pogonatum* (2), *Polytrichum* (2).

39. Observations on the growth of the stem and development of the reticulated mantle of *Dictyophora indusiata* (PERS.) FISCHER. (Japanese). Seiiti KAWAMURA. **(J. Jap. B. 15, 1939, 488–494, 8 text-figs.).**

The author has found underground a number of *Dictyophora indusiata* individuals in their bud stage. He has brought them to his laboratory and planted each in a pot. The observations were done in a very moist room at the temperature 20° (June 28, 1937). The results are as follows.

The stem has pushed out through the closed peridium at 9 o'clock A.M., has grown to 43 mm at 10 o'clock, and 79 mm at 11 o'clock. Thereafter the velocity of elongation has increased so suddenly, that the growth of 45 mm has been observed in 15 minutes. The velocity of growth has then begun to decrease, and at 10 o'clock 5 min. the total growth length reached 152 mm. The growth ratio per min. is thus 0.72 mm between 9 and 10 o'clock, 0.6 mm between 10–11, 3.0 mm between 11–11¼, 0.87 between 11¼–11½, 0.43 mm between 1½–12¼.

Reticulated mantle begins to expand shortly before the stoppage of the stem elongation, and begins to elongate (hang down) soon after that. During 65 minutes lying between 12 o'clock 10 min. and 1 o'clock 15 min. P.M. the elongation of 123 mm has been executed. The velocity per minute was in this case 0.7, 1.4, 2.2, 4.0, 1.0, 3.6, 4.4, 0.8, 1,8, 1.2 mm successively,

All results are shown in graphs.

40. Morphologie der Artbastarden bei der Gattung *Aegilops*. (Vorl. Mitt.). (Japanisch). Hitoshi KIHARA und Kenzô MATUMOTO. **(J.J.G. 15, 1939, 334–336 m. 1 Tab.).**

Die Gattung *Aegilops*, die im ganzen 23 Arten umfasst, wird von KIHARA zu 6 Sektionen eingeteilt, mit der Berücksichtigung der Resultate seiner genomanalytischen Untersuchungen. In den vorliegenden Bastardierungsversuchen dieser Gattung wird besonders das Verhalten der Aehrenbrüchigkeit sowie der Begrannung der Spelzen berücksichtigt.

Bei einer Anzahl der in dieser Gattung enthaltenen Arten fallen die reifen Aehren als ganzes ab (Umbellaluta-Typ). Bei den anderen zerfällt jede reife Aehre in einzelne Aehrchen, wobei die Spindelachse entweder unmittelbar unter jedem Aehrchen (fassförmiger Typ) oder unmittelbar oben demselben (keilförmiger Typ) zerbricht, um somit das letztere mit dem ihm anliegenden Achsenstücke zusammen abfallen zu lassen. Der Umbellaluta-Typ ist phylogenetisch als der jüngste, und der keilförmige als der älteste aufgefasst. Bei der Bastardierung Umbellulata × fass-

förmig dominiert der erste oftmals (z.B. bei der Sektion Polyides), aber nicht immer, indem z.B. bei *Ae. ovalis*×*ventricosa* beide Umbellulata und fassförmig in F_1 auftreten. Bei der Bastardierung fassförmig×keilförmig war in einem Falle der erste und in einem anderen der zweite dominant. In einem dritten Falle war der F_1-Bastard vom Umbellulata-Typ, doch zerbrach die Aehre nach dem keilförmigen Schema.

Bezüglich der Begrannung der Deck- und Hüllspelzen kann man drei Fälle unterscheiden, nämlich unbegrannt, eingrannig und vielgranning, wobei der erste Typ phylogenetisch als der älteste und der dritte als der jüngste aufgefasst werden. Inbezug auf die Hüllspelzen zeigt der Bastardierungsversuch das Dominanzverhältnis, vielgrannig>eingrannig>unbegrannt. Betreffend der Begrannung der Deckspelzen sieht man das dem obigen gleichartige Verhältnis bei den endständigen Aehrchen, doch bei den seitenständigen weist man in F_1 das Dominieren des Unbegranntseins nach.

41. La multiplication végétative d'*Hypericum laxum*. (Avec un sommaire japonais). Yojiro KIMURA. (B.M.T. **53**, 1939, 427–428, 5 fig.).

L'*Hypericum laxum* étant une plante annuelle, bien que toutes ses parties périssent en hiver, seulement les bourgeons terminaux ou quelquefois même ceux axillaires survivent alors. Tels bourgeons qui sont densement feuillés, se détachant du pied-mère, tombent sur la terre, où au printemps suivant chacun d'eux ne tarde pas à pousser des racines et à donner naissance à un nouvel individu.

42. Species and varieties of *Hovenia*. (With Japanese résumé). Yojiro KIMURA. (B.M.T. **53**, 1939. 471–479, 1 pl. and 18 text-figs.).

After the introduction which treats of the flower, fruit, seed, inflorescence, and leaf of *Hovenia* a key for the identification of the species and varieties contained in this article is given. The following plants are enumerated or described: *Hovenia dulcis* THUNB. var. *glabra* MAKINO, var. *latifolia* NAKAI var. nov., var. *koreana* NAKAI var. nov., *H. acerbe* LINDLEY, *H. parviflora* NAKAI et Y. KIMURA sp. nov., *H. tomentella* (MAKINO) NAKAI stat. nov. *H. robusta* NAKAI et Y. KIMURA sp. nov.

43. Chromosomenzahlen einiger *Gerbera*arten. (Japanisch m. deutsch. Zfg.). Enko KISHIMOTO. (B.Z. **7**, 1939, 1877–1878, 2 Textfig. gruppen.)

Gerbera Jamesoni BOLUS aus Europa und kultiviert in Japan: 2n=50 (Wurzelspitze),n=25(PMZ).

G. integrifolia HAY. aus Formosa und *G. Anandria* SCHULTZ. BIP. aus eigenem Japan:n=23(PMZ).

44. Notulae ad composites manshuricas. (Chiefly in Japanese). Siro KITAMURA. (A.PT.G. **8**, 1939, 141–147).

The following Manchurian composites are enumerated, and the distribution of each species is announced in detail: *Artemisia rubripes* NAKAI, *A. mongolica* FISCHER, *A. Sieversiana* WILLD., *A. campestris* L., *Aster dahuricus* BENTH., *A. spathulifolius* MAXIM., *Brachylactis ciliata* LEDEB., *Lactuca tatarica* C. A. MEY., *Leontopodium Pallibianum* BEAUVERD, *Serratula centauroides* L., *S. Komarovi* ILJIN, *S. polycephala* ILJIN, *Youngia tenuifolia* (WILLD.) BABCOCK et STEBBINGS.

45. On the *Dacryomyces* group. (Fungorum ordinis tremellalium studia monographica III). Yosio KOBAYASI. (Sc. Rpts., T.BR.D. No. **70**, 105–128, 3 pls. and 4 text-figs.).

After the critical study of various genera of the *Dacryomyces* group hitherto proposed by several authors, the present author gives an analytical key for the genera

adopted by him. Then the genera and species contained therein are described with literature. *Ditiola* containing 1 species *D. nuda* BERK. et BR., *Guepiniopsis* containing *G. merulinus* (PERS.) PAT., *G. alpinus* (TRACY et EARLE) Y. KOBAYASI comb. nov., *Dacryomyces*, subgenus Eudacryomyces Y. KOBAYASI subgen. nov., containing *D. deliquescens* (BULL.) DUBY, *D. palmatus* (SCHW.) BURT., *D. aurantius* (SCHW.) FARLOW, *D. adpressa* Y. KOBAYASI sp. nov., *D. subalpinus* Y. KOBAYASI sp. nov., *D. rosatinctus* LLOYD, *D. puniceus* Y. KOBAYASI sp. nov., *D. punctiformis* NEUH., *D. minor* PECK, *D. applanatus* Y. KOBAYASI sp. nov., *D. tremellosus* Y. KOBAYASI sp. nov., subgenus Turbinaster Y. KOBAYASI subgen. nov., containing *D. pulcher* Y. KOBAYASI sp. nov., *D. chrysocornus* (BULL.) TUL.

46. On the genera *Femsjonia*, *Guepinia* and *Calocera* from Japan. (Fungorum ordinis tremellalium studia monographica IV). Yosio KOBAYASI. (Sc. Rpts., T.BR.D. No. **74**, 1939, 215–227, 2 pls.).

The following genera and species are described. For each genus an analytical key for the determination of the species contained therein is given.

Femsjonia luteo-alba FR., *F. orientalis* Y. KOBAYASI sp. nov., *Guepinia Spathularia* (SCHW.) FR., *G. fissa* BERK., *G. imazekiana* Y. KOBAYASI sp. nov., *Calocera cornea* (BATSCH.) FR., *C. corniformis* Y. KOBAYASI sp. nov., *C. alba* Y. KOBAYASI sp. nov., *C. palmata* (SCHW.) FR., *C. flavida* LLOYD, *C. coralloides* Y. KOBAYASI sp. nov., *C. viscosa* (PERS.) FR.

47. Contributiones ad cognitionem florae Asiae Orientalis. (Continued). Gen'iti KOIDZUMI. (A.PT.G. **8**, 1939, 188–194).

The following new species are described:

Commelina rupiphraya, *C. nipponica*, *C. diabolica*, *Pyrus nehiyamadonis*, *P. ugoensis*, *Phryma nana*, *P. humilis*, *Arundinaria kisoensis*, *Sasa Hidejiroana*, *S. hiyeiana*, *S. tsukubanantaicola*.

48. On the problem of influence of oxygen surrounding the aerial part of the plant upon the elongation of the root and the cell-division of the root-tip. (Japanese with English résumé). Hitoshi KOJIMA. (B.S.F.T., K.I.U. **8**, 1939, 315–320).

Formerly the author has shown concerning the young roots of *Vicia Faba* cultivated in tap-water that the higher the rate of oxygen dissolved in it, the more intense are the rate of its elongation as well as the frequency of cell-divisions. (Cf. this JOURNAL **9**, (49), No. 196). In the article cited in the above title the author has described the results of his experiments on the problem, how will the elongation of root and its cell-division behave, when oxygen is not directely supplied to the root, but indirectly through the aerial part. The method of experimentation consists in immersing the root in tap-water deprived of oxygen by boiling and placing the aerial part in normal air, in air deprived of oxygen by pyrogallol solution, or in pure oxygen. The plant, of which the root was immersed in tap-water, which was constantly bubbled, served as the control. The rate of elongation as well as the frequency of cell-division were almost the same in the above three sets; the rate of elongation was almost 10% as compared with the control above indicated, and the frequency of cell-division was simply 2–3% as compared with another control culture in moist saw-dust.

49. Ueber die Sortenunterscheidung durch die Phenolfärbung bei Weizen und Gerste. (Japanisch). Mantarô KONDÔ und Yasuo KASAHARA. (P.C.S.S.J. **11**, 1939, 230–252, 6 Tabellen).

Seit der W. HERMANNS merkwürdigen Entdeckung im Jahre 1924 haben viele Forscher die Unterscheidung von Weizen- und Gerstensorten durch die Phenolfärbung untersucht. Der vorliegende Aufsatz von beiden Verff. beschäftigt sich auch mit dieser Frage.

Die Behandlungsweise von Weizen- und Gerstenkörnern für dieses Experiment ist wie folgt: die Körner, welche 24 Stunden lang im warmen Wasser vorgequollen sind, werden mit ihrer Bauchseite in der mit einem Stück Fliesspapier bedeckten Innenfläche einer PETRIschale eingelegt, und dann darauf wird 1% Phenollösung gegossen, und zwar je 2 ccm pro Schale bei der Temperatur 15°, und nach 24 Stunden werden die ausgetrockneten Körner nach ihrer Farbe untersucht: sie sind entweder ungefärbt oder braungefärbt, und im letzten Falle in verschiedenen Nuanzen nach verschiedenen Sorten, und zwar so verschieden, dass man darauf fussend die Sorten unterscheiden kann. Die Unterschiede treten viel klarer hervor bei den Weizen- als bei den Gerstensorten. Die Verff. haben im vorliegenden Aufsatz die Unterschiede der japanischen Weizen- und Gerstensorten in dieser Hinsicht ausführlich in einer Tabelle hervorgehoben, wofür auf das Original verwiesen sei.

Die Phenolfärbungsreaktion der Weizen- und Gerstenkörner geht beim ihren jüngsten Zustande sehr langsam und ist höchst dünn, und um zehnten Tage oder später nach dem Blühen zeigen sie die schnellste und höchste Färbungsreaktion. Betreffend den Einfluss der Temperatur auf die Färbung wurde es festgestellt, dass sie bei 60° am intensivsten, bei allen anderen Temperaturen schwächer, und bei 100° ganz sistiert ist, Bei 0° haben die Verff. eine sehr leichte Färbung wahrgenommen.

Eine wichtige Frage ist, wie die Phenolfärbung der Weizen- und Gerstenkörner verursacht wird. Bisher gab es darüber zwei verschiedene Meinungen, von denen die erste diese Färbung als für eine chemische Reaktion hielt, während die andere sie als die Wirkung der in den Körnern enthaltenen Oxydase auffassen will. Die obengenannten Verff. sind nach der zweiten von obigen Meinungen geneigt, und zwar auf Grunde der folgenden Tatsachen: 1. die Körner, welche im voraus einer hohen Temperatur, z.B. 105–110° ausgesetzt waren, nahmen allmählich an ihrem Färbungsvermögen ab, um schliesslich es ganz zu verlieren, je nach der Wirkungsdauer hoher Temperatur, 2. das Wasser, worin die Körner einiger Zeit lang eingetaucht waren, zeigten die Phenolreaktion, wie die Körner selbst, und wenn solches Wasser einiger Zeit lang der Temperatur 105° ausgesetzt wird, so ist die Färbung nicht mehr erkennbar. Nach den Verff. muss dabei die Hitze die Wirkung der in den Körnern enthaltenen Oxydase sistiert haben.

Man kann für diese Färbung statt des Phenols auch das Paracresol oder Benzidin verwenden, wenn das Phenol vorzuziehen ist.

50. Veränderung der hygroskopischen Wasseraufnahmefähigkeit von Gewebepulver in Beziehung zur Verschiedenheit des spezifischen Pulvergewichtes von Pflanzen. (Japanisch m. deutsch. Zfg.). Riichiro KÔKETSU und Fumio ÔTUKI. (B.S.F.T., K.I.U., 8, 1939, 374–384).

Es wurde untersucht, wie die hygroskopische Wasseraufnahmefähigkeit des Gewebepulvers von den äusseren und inneren Bedingungen der Pflanze beeinflusst wird, und wie diese Fähigkeit sich zur Veränderung des spezifischen Pulvergewichtes verhält. Die genannte Fähigkeit des Gewebepulvers und das spezifische Pulvergewicht wurden nämlich nebeneinander bestimmt, und zwar an verschiedenen Gewebepartien von normalen aber unter verschiedenen Bedingungen kultivierten Pflanzen und weiter an verwelkten.

Nach dem Resultat werden sowohl der Wert der hygroskopischen Wasseraufnahmefähigkeit als auch der Wert des spezifischen Pulvergewichtes miteinander durch die Verschiedenheit der inneren und äusseren Bedingungen merkwürdig beeinflusst, indem diese beide Werte immer mit einander beinahe direkt proportionalen Beziehung stehen. Das spezifische Pulvergewicht kann deswegen ein Index für das Wassersaugungs- oder Wasserfesthaltungsvermögen des Gewebepulvers bzw. der Pflanze sein.

R. KÔKETSU.

51. Über das Hämoprotein aus den Wurzelknöllchen von Leguminosen. (Vorläufige Mitteilung.) Hideo KUBO. (A.P. **11**, 1939, 195-200, 2 Textfig.).

Es ist schon bekannt, dass die Wurzelknöllchen der Leguminosen eine rosafarbige Substanz enthalten, aber die chemische Natur dieser Substanz ist bis jetzt noch nicht genau bekannt. Die vorliegende Mitteilung befasst sich nun mit den merkwürdigen Eigenschaften von demselben Farbstoff. Die rote Substanz ist ein Chromoproteid, das durch Ammoniumsulfat fraktioniert gefällt wird und die charakteristischen Absorptionsbanden zeigt. Werden die Wurzelknöllchen von Leguminosen mit Wasser zerrieben und dann scharf abzentrifugiert, so erhält man eine klare rotgefärbte Lösung, die mit Pyridin die typischen Pyridin-Hämochromogen-Banden bei 557 mμ und 530 mμ aufweist. Die Absorptionsbanden des isolierten Farbstoffs liegen unter Luftzufuhr bei 575 mμ und 540 mμ (bei pH 6.0), welche sich beim Zusatz von Na-Hydrosulfit in eine breite Bande bei 555 mμ umwandeln. Man kann aus diesem spektralen Verhalten schon darauf schliessen, dass die rote Substanz der Leguminosenknöllchen ein Protohämatin-Protein-Komplex ist. Die physiologische Bedeutung dieses Hämoproteins ist zwar noch nicht in allen Punkten klar gestellt, aber es erscheint dem Verf. wahrscheinlich, dass diese Substanz irgendwie mit dem Sauerstoffatmungsvorgang des Wurzelknöllchens verknüpft sein dürfte. Die Wurzelknöllchen von den untersuchten 24 Leguminosen-Gattungen enthalten immer dieses Hämoprotein. Verfasser.

52. On the vascular course in the male inflorescence of *Zea Mays*. Vascular anatomy of maize. I. (Japanese with English résumé). Masao KUMAZAWA. (B.M.T. **53**, 1939, 495–505, 5 text-figs.).

By examining the serial microtome sections the author has traced the course of vascular bundles in the male inflorescence of *Zea Mays* down to the middle part of the stem. The following is taken from the author's own summary.

At the terminal part of the inflorescence axis one or several large medullary bundles and about ten small peripheral ones are found; the former go down through at least six nodes of successive leaves without any connection with leaf traces (cauline bundles). In the lower part of the axis large medullary bundles are represented by cauline bundles as well as branch traces originating from lateral shoots (peduncles and the axes of secondary shoots). These bundles descend gradually to migrate towards the periphery of the stem and diminish in size, while the branch traces fuse with leaf traces. The connecting mode of branch traces to the mother axis is quite simple at the uppermost part of the axis, and most complicated in the lower part, for which cf. the original.

53. Geschlechtschromosomen bei *Trichosanthes multiloba* MIQ. und Chromosomenzahlen bei einigen anderen Arten von Cucurbitaceen. (Japanisch m. deutsch. Zfg.). Masahide KURITA. (B.M.T. **53**, 1939, 505-510, 1 Textfig. und 1 Textfig. gruppen).

Bei PMZ von *Trichosanthes multiloba* fand der Verf. in der I. Metaphase 11 Gemini, von denen 1 X-Y darstellt, sodass die Chromosomenformel davon wie folgt steht: ♂ $2n=20+X+Y$.

Ferner wurde die Chromosomenzahl (n oder besonders 2n) bei einer Anzahl von Cucurbitaceen (*Actinostemma*, *Benincasa*, *Citrullus*, *Lagenaria*, *Luffa*, *Melothria*, *Momordica*, drei Arten *Trichosanthes*) untersucht: 2n beträgt 14, 16, 22, 24, 26 oder 44.

54. Miscellaneous notes on the flora of the Eastern Asia X–XIV. (Japanese with Latin diagnoses). Genkei MASAMUNE. (T.N.H.S.F. **29**, 1939, 179–182, 216–219, 238–242, 269–274. 1 text-fig., 339–344, 1 text-fig.).

The following new species are noticed: *Mussaenda taihokuensis*, *M. yaeyamensis*, *Galium taiwanense*, *G. maborasense*, *Daphne taiwaniana*, *Smilax Simadai*.

Besides several other plants are enumerated, which contain a number of new varieties,

55. Phage-produced resistant strains of *Bacillus aroideae*. 1. Resistant strains which appeared in culture solutions. Takashi MATSUMOTO. (T.N.H.S.F. **29**, 1939, 318–338).

The method of preparing the bacteriophage specific for *Bacillus aroideae* consists in heating the phage-bacteria mixture to 60°C for 30 min. without resorting to the ultrafiltration, as was done formerly by the author.

When incubated at 31° C, the maximum accumulation of the phage takes place usually within 18–30 hours, and its gradual diminution is observed as the time goes on, until after 10 days it becomes hardly discernible. When incubated at 31°C, the so-called phage-resistant strains are produced within 12 hours, and gradually increase and outnumber the usual organisms after 24 hours. Though *Bacillus aroideae* is characterized by its phage sensitivity and agglutinability, it seems that there is no connection between the two characters, inasmuch as the conversion of the organisms to the phage-resistant strains does not necessarily result in the loss of the agglutinability in the antiserum. Neither does this conversion have any influence on the pathogenicity and fermentative activity.

The phage-susceptible strains found in later stage of incubation may be the variants evolved from the phage-resistant strains after the diminution or loss of the lytic activity.

56. Need of reinvestigation on the use of *Trichoderma* as a means of biological control. (Japanese with English résumé). Takashi MATSUMOTO. (J.S.T.A. **11**, 1939, 322–326, 2 text-figs.).

Root-rot of garden roses, crotons, etc. noticed in Formosa since several years, seems to be closely related to CRABILL's root-rot of apples caused by *Trichoderma Koeningii*. The author's inoculation experiments have shown that his fungus is a weak parasite which will be able to attack plants which are already weakened on account of certain causes. WEINDLING has shown that *Trichoderma lignorum* lives parasitic on *Rhizoctonia solani*. An exactly parallel fact seems to exist concerning the author's *Trichoderma*, because when an inoculum of *Hypochnus Sasakii* is placed in close contact with the author's *Trichoderma* on a leaf of *Eichhornia crassipes*, no infection takes place. The reinvestigation of the author's fungus will be necessary for using *Trichoderma* as a means of biological control.

57. Weitere Untersuchungen über die pentaploiden *Triticum*-Bastarde X. Kreuzungsversuch mit gemischtem Pollen. Seiji MATSUMURA. (Jap. J.B. **9**, 1940, 477–487, 2 Textabb. und 4 Tab.).

58. Problem of the secondary association of chromosomes. (Japanese with English résumé). Hajime MATSUURA. (B.Z. **7**, 1939, 1665–1671, 11 text-figs.).

According to the author the phenomenon of secondary association of chromosomes seems to be widely prevalent in the plant kingdom, so, for instance, this phenomenon has been hitherto discovered by the workers of his Laboratory in plants belonging to 30 genera and 45 species, among which *Carex pilosa* is cited as an instance of the secondary pairing, where no such process has hitherto ever been observed.

An interesting instance of this phenomenon is cited in respect to mature wall-cells of anther in *Veratrum oxyspatum* with n=16. In the cells where the nuclear division has already stopped after the late telophase, the secondary pairing of chromosomes takes place very frequently, so that finally the number of chromosomes is reduced to 8. The author thinks that the force leading to secondary pairing is essentially the same as that causing the somatic pairing.

59. Contributions to the flora of Northern Japan XII. (With Japanese résumé). Kingo MIYABE and Misao TATEWAKI. (T.S.N.H.S. **16**, 1939, 1–8, 1 text-fig.).

Among a number of plants enumerated the following new species are described: *Astragalus fujisanensis* MIYABE et TATEWAKI sp. nov., *Primula kamuiana* MIYABE et TATEWAKI sp. nov. (illustrated), *Sasa tokatiensis* TATEWAKI et YOSHIMURA sp. nov..

60. Studies on the gametophytes of ferns (XI)–(XII). On the prothallium of athyrioid ferns. (Japanese). Siduo MOMOSE. (J. Jap. B. **15**, 1939, 633–651, 712–726, 27 text-figs.).

The development of the following species are described and illustrated: *Athyrium iseanum, niponicum, yokoscense, melanolepis, Vidalii, multifidum,* var. *deltoideum, Sheareri, Cornopteris decurrentiaalata, Diplazium Conilii, Dryopteris Okuboana, tosaensis.*

61. *Osmanthus* of Taiwan. (Japanese with Latin diagnoses). Kunihiko MORI. (J. Jap. B. **15**, 1939, 542–561, 15 text-figs.).

The genus *Osmanthus* of Formosa (Taiwan) contains in all 7 species and 1 variety according to the author. It comprises two sections, Euosmanthus and Micro-osmanthus. The former is distinguished by the cymose inflorescence with extremely shortened axis, while the latter is characterized by the trichotomous cyme. The former section contains *Osmanthus acutus* MASAMUNE et MORI sp. nov., *O. enervius* MASAMUNE et MORI sp. nov., *O. ilicifolius* STANDISH, var. *bibracteatus* (HAY.) MORI com. nov., *O. lanceolatus* HAY. The latter section contains *O. Matsudai* HAY. and *O. Matsumuranus* HAY. and *O. Wilsonii* NAKAI.

62. Soil respiration of the *Sasa* community. (Japanese with English résumé). Ryûya MORI. (E.R. **5**, 1939, 291–303).

The absorption of CO_2 in the assimilation process far exceeds its evolution in the respiration, and notwithstanding such discrepancy existing between its absorption and evolution, its quantity remains almost constant in the nature. This is due to the action of various compensating processes, of which the soil respiration should be considered as one of the most prominent. As FEHHÉR has noticed, the soil respiration is chiefly ascribable to the action of soil bacteria, so that the greater the number of the latter, especially cellulose-decomposing ones, the more intense will be the soil respiration.

The author has performed a series of experiments concerning this problem in the *Sasa* community near the Laboratory in Mt. Hakkôda. According to his experiments

the respiratory intensity of the surface soil of this community is far lower than that of ordinary soil, only 1.20 mg CO_2 being evolved per hour and per 100 gr soil. This intensity was however twice or more as high as that of soil at the depth of 10 cm, and that of the latter was twice or more as high as that of soil at the depth of 20 cm. Beyond this depth no appreciable difference was observed till the depth of 50 cm. The reason, why such difference will be observed in different depths, may be interpreted in terms of ignition loss and the water content of each.

It is further to be remarked that the intensity of soil respiration is correlated with the temperature of the surface soil, and since the latter is under the influence of air temperature, this intensity is correlated with the latter, though indirectly.

63. The size and form of rice caryopses, and their mode of inheritance. (Preliminary note). (Japanese with English résumé). Toshiro MORINAGA, Kazuo NAKAJIMA and Takeo YUMEN. (J.J.G. **15**, 1939, 225–235, 2 text-figs. and 6 tables).

Under natural condition the size and form of the caryopsis of rice are exactly fitted to the inside of the lemma and palea covering it, but if the latter are partially cut off as usually done in the case of the hybridization experiment, the caryopsis which is freed takes its own characteristic size and shape which are different from those seen under natural condition. The authors have made some experiments concerning such freed caryopses in certain rice strains. Some of the experimental results are summarized below.

In comparison with normal caryopses, freed ones are narrower and longer, and in some strains they become somewhat curved at the apical part (claw-shaped), while in others they remain straight. The weight decreases generally by this treatment. The pericarp is thicker in freed caryopses than in normal ones, and in one case the colour reaction by phenol was recognizable, as in some barley strains.

The reciprocal hybridization between any of the two strains which differ in size and shape of caryopses, have shown that the F_1 offspring always resemble the mother plant in this respect. Equally so was it with the growth rate in the young stage, though the mature F_1 plants coming from the two reciprocal hybridizations show no difference in this respect. In size and shape the F_2 caryopses were intermediate between the two original parents in one case while in the other they are not intermediate, but as long as those of the parent with larger caryopses.

In the case of normal caryopses no sign of Mendelian segregation was recognized, but in those of freed ones the coefficient of variation was markedly larger, and the variation curve was bimodal instead of being monomodal as in normal case. Finally the colour reaction of the pericarp by phenol was observed to behave as a partial dominant in hybridization.

64. On the chlorosis of plants and its curing. (Japanese). Keizi MORITA. (E.R. **5**, 1939, 161–164).

The water-culture of *Alopeculus fulvus* was performed, the ferric citrate being used as the source of iron at pH 4–6. Plants were then normally green. After a certain lapse of time the pH of the same nutrient solution was raised to 8 and then the chlorosis begun to take place: the first leaf developed after this change of pH was green simply at its apex and otherwise pale yellow, while all succeeding leaves were perfectly pale yellow and died. All leaves which have been produced before the pH-change remained however green.

When the water-culture of *Senecio vulgaris* was treated just in the same way

as in *Alopeculus* culture above mentioned, not only are all leaves developed after the pH-change yellow, but also the older green leaves formed before it become pale yellow.

Thus we may distinguish the two types of chlorosis in accordance with the observations of GILE and CARRERO (1916) respecting rice and pine-apple.

65. Influence of Fe and Mn on the formation of sugars and starch. (Japanese). Keizi MORITA. (E.R. **5.** 1939, 316–319).

That the addition of minute quantities of Fe or Mn will increase the crop, is well known. The author, in his water-culture experiments of *Alopeculus fulvus*, has studied the influence of Fe and Mn in the formation of sugars and starch. Three series of culture were performed for this purpose, viz. that with neither Fe nor Mn, that with Fe and that with Mn. The results are summarized below.

In respect to starch, monosaccharides and saccharose contained in culms and fruits the quantity of the first kind of substances is most predominating in any of the three experimental series above indicated, while that of the second and third is quite small, and in culms monosaccharides>saccharose and in fruits monosaccharides=saccharose (nearly). The addition of Fe or Mn leads to the increase of starch and saccharose, in culms, but simply to that of monosaccharides in roots. The percentage relation of the three kinds of substances is different in three culture series, thus, for instance, in fruits

	Starch	Monosaccharides	Saccharose
Fe-culture	84.9%	6.8%	8.3%
Mn-culture	92.0%	4.0%	4.0%
Culture with no Fe and no Mn	100.0%	0.0%	0.0%

The formation of assimilation starch was found to be greater in the Fe-culture than in the Mn-culture, but it is just the reverse in respect to reserve starch, provided both are of equal concentration.

66. Notulae ad plantas Asiae Orientalis (VIII)-(XI). (With Japanese résumé). Takenoshin NAKAI. (J. Jap. B. **15,** 1939, 401–421, 523–541, 672–692, 735–753).

The following species are described, together with an enumeration of many forms: *Viola flaviflora* sp. nov., *V. senamiensis* sp. nov., *V. lucida* sp. nov., *V. Hosoi* sp. nov., *Arisaema izuense* sp. nov., *A. proliferum*, *Arundinaria confusa*, *A. decipiens*, *Corylus sutchuensis*, *Quercus kirinensis*, *Axyria koreana*, *Cerastium sinicum*, *Berberis borealisinensis*, *Rosa misimensis*, *Astragalus Nagaii*, *Lespedeza inabensis*, *L. ionocalyx*, *Stachyrus ovalifolius*, *Ledum zokuriense*, *Deutzia obscura*, *Sorbus chionophilla*, *Elaeagnus higoensis*, *E. Mayebarai*, *Bupleurum borealisinensis*, *Peucedanum hakuunensis*, *Cynoxylon hopeiensis*.

67. White-flowered varieties of *Dasiphora fructicosa* native in Japan and China. (Japanese and English with Latin diagnoses). Takenoshin NAKAI. (J. Jap. B. **15,** 1939, 595–601, 2 text-figs.).

First of all, the author indicates the error committed by the previous botanists in respect to the nomenclature of white-flowered forms of *Dasiphora fructicosa*. An analytical key for the latter in general as well as that for the latter in Eastern Asia are given. The following are native to Japan and China: *Dasiphora fructicosa* (L.) RYDBERG var. *coreana* NAKAI, var. nov., var. *leucantha* (MAKINO) NAKAI com. nov., var. *Veitchii* (WILSON) NAKAI comb. nov.

68. Iconographia plantarum Asiae Orientalis Vol. III, No. 2. Tokyo. Edited by Takenoshin NAKAI, 7 pls. and 15 pages text.

All 7 plants contained in this No. refer to the species of the genus *Arisaema* originating from Japan proper. They are *Arisaema heterophylla* BLUME var. *typicum* MAKINO, *A. kiushianum* MAKINO, *A. akiense* NAKAI sp. nov., *A. stenophyllum* NAKAI et F. MAEKAWA, *A. Takedai* MAKINO, *A. ternatipartitum* MAKINO. All are from the pen of NAKAI, except the last one which is due to H. HARA.

69. Weitere Untersuchungen über den Wasserstoffumsatz bei den Purpurbakterien, nebst einer Bemerkung über die gegenseitige Beziehung zwischen Thio- und Athiorhodaceen. Hirosi NAKAMURA. (A.P. **11**, 1939, 109–125, 9 Tab.).

An Hand zweier Typen von Purpurbakterien, *Rhodobacillus palustris* (Athiorhodacee) und *Chromatium minutissimum* (Thiorhodacee), wurde der Wasserstoffumsatz bei den Stoffwechsel vergleichend untersucht. Die beiden Typen von Purpurbakterien sind befähigt, Methylenblau, Nitrat, Nitrit, Fumarsäure, Äpfelsäure, Asparaginsäure, Glycerinaldehyd und Hexosediphosphat u.a. mit Hilfe von Hydrogenase in H_2-Atmosphäre zu reduzieren. Die Schwefelverbindungen, wie Sulfat, Sulfit und Thiosulfat, die durch *Chromatium* mit Hilfe von Hydrogenase in H_2-Atmosphäre reduziert werden, beteiligen sich bei dem Stoffwechsel von Thiorhodaceen als Lieferanten von H_2S, den die Bakterien bei bakterieller Photosynthese benutzen können. Während *Rhodobacillus* den Schwefel als H-Akzeptor bei Hydrogenase-Wirkung benutzen kann, ist *Chromatium* nicht imstande, denselben in H_2-Atmosphäre zu reduzieren. Das Vorkommen bzw. Nichtvorkommen des Schwefelkügelchens im Zellinnern bei Thio- bzw. Athiorhodaceen hängt also lediglich von der An- oder Abwesenheit eines Enzyms oder Enzymsystems ab, das auf den elementaren Schwefel, der infolge der bakteriellen Photosynthese entsteht, spezifisch reduzierend einwirkt. *Rhodobacillus* und *Chromatium* spalten eine deutliche Menge Wasserstoff—unter Beteiligung von Hydrogenlyasen—nicht nur bei Zugab von Ameisensäure bzw. Glucose, sondern auch bei Zugabe von Glycerin, Glycerinphosphat und Brenztraubensäure ab. Verfasser.

70. Hydroperoxyd und bakterielles Leuchten. Hirosi NAKAMURA. (A.P. **11**, 1939, 159–165, 1 Fig. u. 5 Tab.)

Trotzdem eine Leuchtbakterie, *Micrococcus phosphoreus*, sich ganz aerob entwickelt, zeigte sie keine wahrnehmbare Katalasewirkung. Das steht mit Dehydrierungstheorie WIELANDS im Widerspruch, weil die aerob wachsenden Bakterien gewöhnlich eine bedeutende Menge Katalase enthalten und durch ihre Wirkung das bei Dehydrierungsvorgängen entstehende H_2O_2 aufspalten und entgiften. Nun hat der Verfasser die Annahme gemacht, dass das Luciferin in Leuchtbakterien direkt mit H_2O_2 reagiert und an Stelle der Katalase auf demselben entgiftend wirkt. Diese Voraussetzung wird wie folgt begründet: 1) Bei O_2-Abschluss, wobei die Bakterien gar nicht leuchten, wird das volle Leuchtvermögen durch Zusatz von H_2O_2 wiederhergestellt. 2) Das H_2O_2-Leuchten ist eine von O_2 sowie von Katalasewirkung vollständig unabhängige Erscheinung, und zwar deshalb, weil es durch Zugabe von spezifischen Katalasegiften gar nicht beeinflusst wird. 3) Während die lebhaft leuchtenden, jungen Bakterien kein H_2O_2 im Nährmedium auftreten lassen, wird in älteren Kulturen, die das Leuchtvermögen bereits verloren hatten, eine Anhäufung von H_2O_2 deutlich nachweisbar. Verfasser.

71. The relation of chlorophyll content to the anatomical structure of leaves in three dwarf types of rice plant. (Japanese with English résumé). Kane NAKAYAMA. (J.J.G. **15**, 1939, 372–280, 5 text-figs. and 6 tables).

Three dwarf types of rice plant, viz Ebisu, Daikoku and Kodaikoku, which are of the genetical constitution AAbb, aaBB and aabb respectively (normal=AABB) are markedly more deeply green than the normal strain. The close examination has shown that the chlorophyl content of their leaves is about 130–150% of that of the latter. The anatomical study of leaves has indicated that the assimilation tissue in those of dwarfs in the region of small vascular bundles is generally about twice as thick as that in the normals, and that the size of palisade cells and further, the number of assimilation tissue layers are greater in the former than in the latter.

72. Cytogenetical studies in *Avena* II. On the progenies of pentaploid *Avena* hybrids. Ichizo NISHIYAMA. (Cyt. **10,** 1939, 88–100, 11 tables).

About ten years ago it was found by the author (1929) that the maturation division of pentaploid *Avena* hybrids are very abnormal, causing high sterility of the hybrids. The present work gave further studies on the progenies from one of these hybrids, *A. barbata*×*fatua*.

The chromosome number of the offspring was found to show a wide variation from 42 to 67 ($2n$). Also the chromosome configuration was usually very variable in the same plant and varied even more from plant to plant. It is noticeable that the mode of chromosome number change differs from that of triploid *Avena* hybrid.

There were obtained some hyperhexaploids having 22_{II}, 24_{II}, 25_{II} and an octoploid plant with 28_{II}. The plant with 22_{II} nearly bred true but the others did not, on account of the occasional failure of chromosome pairing at meiosis. The chromosome configuration "21_{II}" is the most balanced type, and the majority of the other configurations appears to have a tendency to return to that configuration in later generations.

The offspring also showed a wide variation on the fertility and plant vigour. In general, it is hard to find a definite correlation between sterility and chromosome numbers. The constantly high production of seeds is observed in plants with 21_{II} and 22_{II}. Author.

73. Cytogenetic studies in *Avena*. III. Experimentally produced eu- and hyperhexaploid aberrants in oats. Ichizo NISHIYAMA. (Cyt. **10,** 1939, 101–104, I text-figs.-group).

In a previous work, the author obtained two constant strains with 21_{II} (Pc-1 and Pc-2) and one strain with 22_{II} (Pc-3) in the offspring of pentaploid hybrids between *Avena barbata* and *A. fatua*. Among these strains and *A. fatua* all of six possible crosses were made and meiotic chromosome conjugations of the F_1 hybrids were studied. From the cytological results the following may be concluded; "Pc-1 possesses quite the same chromosome complement as *A. fatua*.. While Pc-2 has a reconstruction complement of chromosomes, containing 20 pairs of *fatua*-chromosomes and 1 pair of *barbata*-chromosomes which can not mate with any of *fatua*-chromosomes, Pc-3 has the same complement as Pc-2 and 1 pair of specific *barbata*-chromosomes in excess." Author.

74. On the evolution of some grain characters in *Avena*. (Japanese). Ichizo NISHIYAMA. (J.J.G. **15,** 1939, 321–323).

One of the most prominent characters inherent to the *Avena* species is the polymorphism of their spikelets. Basing on these features the author distinguishes four following types of spikelets, viz. *wild type*, caryopsis falling off freely, enclosed in glumes, *intermediate type*, caryopsis adherent but falling off from the base of the

spikelets, enclosed in glumes, *cultivated type*, caryopsis adherent, enclosed in glumes; and *naked type*, caryopsis adherent, readily falling out from between the glumes.

Hexaploid species of *Avena* contain always 2n=42 chromosomes. If in intermediate or cultivated type one pair of the so-called c-chromosomes are eliminated from their respective chromosome group, they will be changed into wild type, which indicates that the gene-complex for the presentation of these respective type characters is contained in the c-chromosome. If, however, one pair of c-chromosomes contained in the chromosome group of wild type are eliminated, the latter will remain as such (2n=40), showing that the gene-complex responsible for wild-type spikelet character is contained in another chromosome than c, e.g.b. The author's further studies have shown that the gene-complex for the naked type lies in the b-chromosome, and that that for cultivated type lying in the c-chromosome as mentioned before is perfectly hypostatic to that for wild type. The view that with four types of spikelets under question it will deal with a case of multiple allelomorphism, is not accepted by the author. From the phylogenetic viewpoint the order of the evolution of the four kinds of spikelets is considered as wild→intermediate→cultivated→naked, and the author's hypothesis is that the evolution of these spikelets should be due to certain mutational changes which have occurred in the b- and c-chromosomes.

75. Studies on artificial polyploid plant II. The effect of colchicine on germinating seeds. (Japanese with English résumé). I. NISHIYAMA, K. FURUSATO, A. MOTIZUKI and T. YASUMOTO. (B.Z. **7**, 1938, 1241–1246, 2 text-figs.).

Seeds of a number of plants, for instance, some Compositae, *Petunia*, *Salvia*, *Verbena*, etc. (altogether 20 species) were immersed in 0.02–0.8% aqueous solution of colchicine during 24–94 hours at 24°C. Though some seeds died by this treatment before germination, the authors have got other seeds which have survived and produced some tetraploids and octoploids (*Petunia*). In *Chrysanthemum coronarium* 56% were observed to have given rise to tetraploids.

76. Eine *Phytophthora*krankheit von Feigen. (Japanisch). Yosikazu NISIKADO, Kôzi HIRATA und Kitizi KIMURA. (A.S. **31**, 1939, 318–340, 18 Abb.).

Nach den Experimenten d. Verff. kann *Phytophthora palmivora* BUTLER die Früchte, Blätter, jungen Stengel usw. von Feigenbäumen infizieren, wenn sogar sie ganz wundlos sind, um damit die charakteristischen Krankheitsflecke zu erzeugen. Die Aepfel, japanischen Birnen, Kakifrüchte, Eierpflanzen, auch Kartoffeln sind angegriffen. Für das Wachstum dieses Pilzes, Minimum Temperatur 5–10°, Optimum 27° und Maximum nahezu 32–33°. Die Konidienbildung findet am besten eher am Orte des mehr oder minder freien Luftzuges statt als am feuchtgesättigten.

77. Zur Kenntnis der pathologischen Anatomie der durch den Bakanaekrankheitspilz infizierten Reishalmen. (Japanisch). Yosikazu NISIKADO und Kitizi KIMURA. (A.S. **31**, 1939, 341–347, 7 Abb. und 2 Tab.).

Die Bakanaekrankheit der Reispflanzen, welche durch *Gibberella Fujikuroi* (SAW.) WR. verursacht wird, wird bekanntlich durch die Ueberverlängerung von infizierten Halmen charakterisiert.

Die anatomischen Studien solcher überverlängerten Halme zeigt, dass die Pilzmyzelien und die kleinen Konidien an ziemlich hoher Stelle derselben erkennbar sind, und zwar im Gefässbündel, besonders in den weitlumigen Gefässen und Interzellularräumen. In späteren Stadien sieht man die Pilzmyzelien im Parenchym um das Gefässbündel. Die Kulturversuche aus verschiedenen Halmteilen hat die obige Tatsache

bestätigt, indem das Vorhandensein des Pilzes am ziemlich hohen Orte der Halme auch damit machgewiesen ist; auch die Verff. haben die interessante Tatsache beobachtet, dass gewisse Halminternodienteile, welche zwischen zwei pilzenthaltenden (oben und unten) gelagent sind, ganz pilzfrei sind.

78. Ueber einen Pilz, welcher die Braunfleckkrankheit von *Evonymus* verursacht. (Japanisch). Yosikazu NISIKADO, Kitizi KIMURA und Yukio MIYAWAKI. (A.S. **31**, 1939, 349-367, 13 Fig. u. 7 Tab.).

Der Pilz, welcher an den Blättern von *Evonymus japonicus* sowie seinen buntblätterigen Sippe (var. *aureo-variegatus*) die braunen Flecke erzeugt, wird durch die Verff. als eine neue Art den Namen *Macrophoma Evonymi-japonici* gegeben. Die Reinkultur dieses Pilzes ist sehr leicht auszuführen, wobei die Pyknidien und Sporen auf der Nährplatte produziert werden. Für sein Wachstum, Minimum Temperatur 10°, Optimum 30° und Maximum ±38°. Die Experimente haben gezeigt, dass bei verschiedenen Arten von *Evonymus* der Pilz durch die Wundstelle leicht ins Innere eindringt und nach ±5 Tagen die Pyknidien erzeugt.

79. Ueber einen Pilz, welcher an *Chaenomeles extus-coccinae* CARR. eine Braunfleckkrankheit verursacht. (Japanisch). Yosikazu NISIKADO, Kitizi KIMURA und Yukio MIYAWAKI. (A.S. **31**, 1939, 369-377, 15 Fig.).

Ein von den obengenannten Verff. hat bei der durch einen Pilz angegriffenen Zierpflanze *Chaenomeles extus-coccinae* gesehen, dass die Blätter braune Flecke produzieren und nachher bald abfallen. Diesen Pilz identifizieren die Verff. zu *Marssonina Mali* (P. HENN.) ITO. An den soeben genannten braunen Flecken sind zahlreiche schwarze Flecke zerstreut gefunden, welche die Pyknidien sind. Ausser diesen letzteren sind die etwas grösseren Flecke auch wahrnehmbar, welche die Pyknidien von *Discosia Artocreas* (TOD) FR. darstellen. Ob dieser letztere Pilz bloss auf schon abgefallene Blätter saprophytische lebt oder zu ihrem Fallen beigetragen hat, ist noch nicht bekannt.

80. Studies über die Eigenschaften der Sporen und Myzelien von *Tricholoma conglobatum* (VITT.) SACC. als die Grundlage für künstliche Vermehrung. (Japanisch). Yosikazu NISIKADO und Kitizi KIMURA. (A.S. **31**, 1939, 379-392, 7 Textfig.).

Tricholoma conglobatum ist ein bei uns ziemlich hochgeschätzter essbarer wildwachsender Pilz. Um sein künstliche Kultur auszuführen haben die Verff. vor allem seine wichtige Eigenschaften studiert, deren Resultate kurz wie folgt zusammengefasst sind:

Für die Keimung der Sporen, Minimum Temperatur 10-15°, Optimum 27° und Maximum ±32°; ihre Keimung beginnt zwischen pH 3.2–9.0 und am besten bei pH 4 oder 7 stattzufinden. Für das Pilzwachsen, Minimum Temperatur 10°, Optimum 24°, Maximum ±32°; pH zwischen 3.6–10.0, am besten zwischen nahezu 5.8–6.6. Auf Kartoffelagar Medium sind die Kolonien reichlich ausgebildet, die Zuckermenge im Medium ±5%, am besten.

81. Notes on the Japanese Musci (II). (With Japanese résumé). Akira NOGUCHI. (J. Jap. B. **15**, 1939, 754–766, 4 text-figs.).

The following are the mosses from Botel Tobago Isl. (Formosa): *Fissidens japonicus* DOZ. et MOLK., *Leucoloma molle* (C. MÜLLER) MITT., *Leucophanes* sp., *Calymperes cristatum* HAMPE, *Platyhypnidium Schöttmülleri* (BROTH.) FLEISCH., *Palaleucobryum enerve* (THED.) ZOESKE, f. *falcatum* f. nov., *Oscophorus Wahlenbergii*

BRID. var. *japonicus* NOG., var *longisetus* NOG. var. nov., *O. crispifolius* (MITT.) LINDB. var. *brevipes* (CARD.) NOG. comb. nov., *Leptodontium subdenticulatum* (C. MÜLLER) PAR., *Drepanocladus japonicus* DIXON, *Entodon perichaetialis* (CARD.) NOG. et TOYAMA comb. nov., *Erythrodontium leptothallum* (C. MÜLLER) NOG. comb. nov., f. *tereticaule* (C. MÜLLER) NOG. comb. nov., *Lesquereuxia robusta* LINDL., etc.

82. On the cytological studies in *Reineckia carnea* KUNTH, II. On the behaviour of nucleolus in the meiosis of pollen mother cell. Tsuta NOGUCHI. (B.M.T. **53,** 1939, 318–326, 2 pls. and 1 text-fig.).

By means of staining reaction with FEULGEN's fuchsine-sulphurous acid as well as light green, vanadium red, etc. the conclusion was reached, that both chromosomes and nucleoli contain two different substances, of which one is positive and the other negative towards FEULGEN. In the former the karyotin (chromonema) reacts positively and the matrix (hyaloplasma) negatively. The nucleolus is chiefly composed of negatively reacting plastin, but it contains minute foamy structures, to which a new name "nucleolinus" was given. The membrane of the nucleolus as well as its components situated at the periphery of the nucleolinus react positively towards FEULGEN. Further, it was concluded that in the course of meiosis (prophase) the nucleolus supplies the material, especially the nucleal-negative one to the chromosome structure, as will be seen from the following facts: viz. firstly, the end of a spireme or chromosome is attached to the surface of a nucleolus, and secondly, the centre of a nucleolus (nucleolinus) communicates with the end of a chromosome by means of a fine thread.

83. Some experiments on the FEULGEN's nucleal reaction. (Japanese with English résumé). Tsuta NOGUCHI. (B.M.T. **53,** 1939, 415–420, 6 text-figs.).

That the FEULGEN's nucleal reaction will be more or less modified or even becomes negative according to the nature of fixing reagents has been shown by some authors. Some experiments of FEULGEN's reaction are described in this article, which consist in treating the material with some non-fixative reagents.

An old mixture of absolute alcohol and carbon tetrachloride which reacts intensely acid (pH=±1) was used as the intermediate for the paraffin embedding of fixed materials (root of *Vicia Faba, Lilium longiflorum, Reineckia carnea, Fritillaria verticillata, Tradescantia virginica*). The nucleal reaction of the karyotin and chromosomes was negative in this case. It was the same in the case of the treatment with 1% alcohol solution of HCl. On the contrary, the material treated with the mixture of absolute alcohol and some acids (nitric, sulphuric, acetic) or ethyline chloride was found to react positively.

84. Studies on the polyploidy in *Nicotiana* induced by the treatment with colchicine II. Growth rate and chemical analysis of diploid and its autotetraploid in *Nicotiana rustica* and *Nicotiana Tabacum*. Yakiti NOGUTI, Hideto OKA and Takayosi ÔTUKA. (Jap. J. B. **10,** 1939, 343–364, 10 text-figs. and 20 tables).

85. Ueber eine anoxytrope Glukosedehydrase aus *Aspergillus oryzae*. Untersuchungen über die Dehydrasen von Schimmelpilze I. Yasuyuki OGURA. (A.P. **11,** 127–144, 1 Fig. u. 14 Tab.).

Eine Glucosedehydrase, die im Gegensatz zur Glucoseoxydase aus *Aspergillus niger* nicht direkt mit O_2 reagieren kann, wurde aus *Aspergillus oryzae* mit Phosphatpuffer (m/10 K_2HPO_4) zellfrei extrahiert. Als H-Akzeptor für diese Dehydrase sind anwendbar: Thionin, *o*-Kresol-indo-2.6-dichlorphenol, *o*-Kresol-indophenol, Phenol-indo-

2.6-dichlorphenol, BINDSCHERDLER-Grün, o-Chlorphenol-indophenol, Chinon, aber nicht anwendber: O_2, Methylenblau, Nilblau, Cresylblau, Indigotetrasulfonat, Toluylenblau, 1-Naphthol-2-Na-indo-2.6-dichlorphenol und Cytochrom *c*. Dabei ist die Anwesenheit der Codehydrase nicht notwendig, so ist diese Glucosedehydrase anders als die Glycosedehydrase aus Leber, die Methylenblau sowie Cytochrom *c* als H-Akzeptor in Anwesenheit der Codehydrase reduziert.

Obwohl die Glucosedehydrase an und für sich nicht direkt mit Sauerstoff reagieren kann, bewirkt sie bei Zugabe eines geeigneten Redoxfarbstoffs wie Thionin oder bei Zusatz von BINDSCHEDLER-Grün in Gegenwart der *Lactarius*-Oxydase eine ergiebige Sauerstoffaufnahme.

Das pH-Optimum dieser Dehydrase liegt in der Nähe von pH 7.8. In saurem Gebiet wird die Dehydrierungsgeschwindigkeit deutlich verkleinert, indem sie bei pH 5.0, wo die Glucoseoxydase aus *Asp. niger* gerade die höchste Wirksamkeit entfaltet, praktisch zur Null sinkt. Verfasser.

86. Critical notes on the anatomical structure of *Acrostichum*. (Japanese with English résumé). Yudzuru OGURA. (B.M.T. **53**, 1939, 540-548, 4 text-figs.).

The anatomical structure of *Acrostichum aureum* has been investigated long ago by some authors, such as METTENIUS, THOMAS and SCHUMANN, but their respective data do not coincide to each other in several respects. The author has studied the anatomical structure of *Acrostichum speciosum* which is probably identical to *A. aureum*, and found that the anatomical structure is variable. He says, "for instance, the lower end of the medullary bundle can either originate independently within the pith or from the inner side of the main stele, and its upper end can either fuse with each other or diminish blindly; the mode of arrangement of vascular bundles in the petiolar base is sometimes different in different petioles, but also even at different levels of one and the same petiole. This will explain the discrepancy of the results among various authors above cited."

The stelar system of *Acrostichum* is so peculiar that it may belong to a new "*Acrostichum* type."

On the rhizome and petiolar base three types of scales were observed, and in one of them the scale is multicellular in thickness.

87. Diploidisation and fruit-body formation in the Hymenomycetes. Kôhei OIKAWA. (Sc. Rpts., T.I.U. **14**, 1939, 245-260, 6 tables).

Two geographical strains from each of the two following Hymenomycetes, viz. bipolar *Stropharia semiglobata* and tetrapolar *Galera tenera* were the objects of the author's studies. The constitution of their fruit-bodies has been preliminarily determined as A_1A_2 and A_3A_4 as well as $A_1A_2B_1B_2$ and $A_3A_4B_3B_4$ respectively. A series of culture of their mycelium, haploid as well as diploid, was practised, and the formation of fruit-bodies was induced.

The first series of the author's culture experiments was by means of so-called three inocula method, where three or sometimes four haploid mycelia coming from one basidium are cultured together in one flask. The analysis of the constitution of fruit-bodies produced in such experiments has revealed that they consist always only of diploid mycelium, and consequently there are only two kinds of haploid mycelia in bipolar *Stropharia* and its four kinds in tetrapolar *Galera*, and no others. To cite one concrete instance from each fungus, in *Stropharia*, inocula A_1, A_2 and A_3, fruit-body A_1A_2, and in *Galera*, inocula A_1B_1, A_2B_2 and A_3B_3, fruit-body $A_1B_1A_3B_3$, etc.

The second series of the author's experiments consists in mating a large haploid mycelium by a small diploid one of the same species. The mating was made in every possible way, and was either legitimate (e.g. $A_1B_1 \times (A_3B_3 + A_4B_4)$ or illegitimate (e.g. $A_1B_1 \times (A_1B_2 + A_2B_1)$. The analysis of the constitution of fruit-bodies developed in such experiments has clearly indicated that the diploidisation has occurred in every case examined. To cite one concrete example from each fungus, $A_5 \times (A_7 + A_8)$, fruit-body A_5A_8 (in *Stropharia*), $A_1B_2 \times (A_3B_4 + A_4B_3)$, fruit-body A_1B_2. A_4B_3 (in *Galera*), etc.

In the above experiments the constitution of fruit-bodies was in most cases uniform throughout one culture, but rarely two fruit-bodies of different constitution were obtained. For instance, from the mating $A_4B_3 \times (A_1B_2 + A_2B_1)$ the fruit-bodies $A_4A_1B_3B_2$ and $A_4A_2B_3B_1$ were derived. It may be concluded therefrom that both kinds of nuclei out of a small diploid mycelium may migrate into a large haploid mycelium.

88. Les lichens embrassent-ils l'*Azotobacter*? (En japonais). Yônosuke OKADA. (Æ.R. **5**, 1939, 73–74).

Il est bien connu que les lichens vivent souvent sur les rochers ou les écorces, etc., qui doivent être extrêmement pauvres en nourriture. Quelques auteurs ont émis l'opinion que certaines espèces de lichens embrassent les cellules d'*Azotobacter* qui leur donneront des substances azotées. Or, l'auteur de cet article a fait les expériences de culture bactériologique concernant les petits morceaux pulvérisés d'un grand nombre d'espèces du lichen (*Buellia*, *Caloploca*, *Chiodecton*, *Cladonia*, *Crocynia*, *Graphis*, *Lepraria Nephromopsis*, *Parmelia*, *Pertusaria*, *Ramalina*, *Stereocaulon*), et chez aucun cas des cultures il n'en a pu jamais démontrer la présence d'*Azotobacter*. Il croît qu'une minime quantité des composés azotés suffise pour la croissance extrêmement douce des lichens et que conséquemment leur symbiose avec l'*Azotobater* n'en soit pas du tout nécessaire.

89. Studies on the microorganisms of "tengu-no-mugimesi" (masses of gelatinous microbes). I. The kinds and the population of the microbes found in "tengu-no-mugimesi." (Japanese with English résumé). Yônosuke OKADA. (E.R. **5**, 1939, 89–104).

The "tengu-no-mugimesi" found in the soil of various parts in the province Sinano has been hitherto studied by various authors, and the presence of a number of microorganisms in the gelatinous mass was announced.

According to the investigation of the present author, though various organisms are present in this gelatinous mass, its essential part is made up of the microorganisms with gelatinous envelop, which may be either of one kind or of the mixture of several kinds. The population of these organisms is extremely large, for the computation has shown that it is of the order of 10^{10} per 1 gr dry weight.

Other microorganisms are also present, but are far inferior in the population and may be considered to be the mere chance concomitants, viz. aerobic and anaerobic protein-decomposing bacteria, *Clostridium pasteurianum*, unicellular Chlorophyceae, etc.

Bacteria which are able to reduce the nitrate were always found, but the presence of those oxydizing hydrogen and methane was not ascertained. Nor was that of *Thiobacterium thioparus* demonstrated.

90. On the Cyanophyceae in the hot springs of Sukanoyu, Mt. Hakkôda. (Japanese with English résumé). Yônosuke OKADA. (E.R. **5**, 1939, 256–266, 1 text-figs.-group).

In the hot spring named in the above title the author has found 8 species of the cyanophycean algae, belonging to the genera *Cyanidium*, *Synechococcus*, *Oscillatoria*,

and *Cylindrospermum*. A new species called *Synechococcus caldarius* is provided with a diagnosis.

91. On a new *Prasiola* from Corea. (Japanese with English résumé with Latin diagnosis). Yoshikazu OKADA. (J. Jap. B. **15**, 1939, 449–452, 3 text-figs.).

Two species of *Prasiola* living in fresh water were hitherto known from Japan, viz. *P. japanica* YATABE from Japan proper and *P. formosana* OKADA from Formosa. Recently a new variety of the latter was discovered in Corea, viz. *P. formosana* var. *coreana* OKADA var. nov. It resembles *P. formosana* in the arrangement and shape of the cells composing its thallus, but it is distinguished from the latter by the thickness of the thallus, the dimension of cells in cross section, as well as the external appearance of the frond.

	thallus thick	cells in cross section
P. formosana	25–40 μ	2–6×16–21 μ
var. *coreana*	29–28 μ	3–5×10–17.5 μ

92. Chromosome number in the genus *Carex*. (Japanese). Syun OKUNO. (J.J.G. **15**, 1939, 332–333).

The somatic chromosome number in several species of *Carex*, studied especially in the root-tip cells is extraordinarily mannifold, as much as twenty kinds of the chromosome number having been observed, viz, 30, 34, 36, 38, 42, 48, 52, 54, 56, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 74, 76, 78, 84, 90. In *C. conica*, that number is variable in different individuals, viz. 34, 38, 42. The somatic chromosomes are generally very minute, and no distinction between large and small ones as often recognized in PMC, is seen here. The somatic chromosome number of all species studied by the author (37 in all) is given in a list.

93. Ueber den Gaswechsel der Pollen II. Kazuo OKUNUKI. (A.P. **11**, 1939, 27–64, 21 Tabellen).

Die Atmung der verschiedenen Pollen wird durch die Atmungsgifte, wie z.B. Blausäure und Kohlenoxyd, bald stark, bald sehr schwach gehemmt, wobei die CO-Hemmung der Atmung durch das Licht fast vollständig aufgehoben wird. Wenn die Atmung durch CO in verhältnismässig hohem Grade gehemmt wird, so ist der Verteilungskoeffizient (K) nach WARBURG konstant und zeigt einen kleinen Wert, während sich K je nach dem CO/O_2-Wert verändert, wenn K gross ist. Die Kurve, die die Abhängigkeit der Atmung von dem Sauerstoffdruck zum Ausdruck bringt, stellt eine rechtwinklige Hyperbel dar. In verschiedenen Pollen wurden die Cytochrombänder (a 605mμ, b 561mμ, c 550mμ) konstatiert. Die Nadi-Reaktion und die Oxydation des p-Phenylendiamins verliefen bei verschiedenen Pollen positiv. Die Indophenoloxydase in Pollen oxydiert das reduzierte Cytochrom c, während Hydrochinon bzw. Brenzcatechin davon kaum angegriffen wird. In ihren Eigenschaften stimmen sie mit KEILINscher Muskelindophenoloxydase überein. Tatsächlich wurde festgestellt, dass das KEILINsche Atmungssystem mittels der Pollen-Indophenol-Oxydase anstatt der Muskel-Indophenol-Oxydase wohl konstruiert wird. Also lässt es mit Recht darauf schliessen, dass betreffs der normalen Atmung der Pollenkörner auch die Cytochrom-Oxydase und das Cytochromsystem eine wichtige Rolle spielen. Daraus folgt weiter, dass sich der Mechanismus der normalen Atmung in höheren Pflanzenzellen von demjenigen der tierischen Zellen nicht bemerkenswert unterscheidet. Der respiratorische Quotient bei der Pollenatmung scheint im allgemeinen 1.0 zu sein. Aber sie vergrössert sich bei Zugabe des Atmungsgiftes, während die O_2-Aufnahme bei *Lilium*

auratum durch das Gift schwer hemmbar ist. Das ist nichts anderes als die Hemmung der PASTEURschen Reaktion. Dies findet auch bei dem Trockenpräparat, welches durch möglichst schnelle Trocknung von den in Wasser suspendierten Pollen in $CaCl_2$-Exsikkator gewonnen wird, und dem Acetonpräparat der Pollen statt. So wird der MEYEROFsche Oxydationsquotient null, während dieser bei den frischen Pollen ungefähr 2 ist. Die Eigenschaften der verschiedenerweise behandelten Pollen z.B. Acetonbehandlung, Trocknung und Verreibung, wurden näher erörtert. Nach THUNBERGscher Methode wurden die Alkohol-, Fumarat-, Glutaminat-, Citrat-, Malat-, Succinat-Dehydrase u.a. in vivo bzw. in vitro nachgewiesen. Die Katalase in Pollenkörnern wird durch verdünnte Lösung von Hydroxylamin vollständig gehemmt. Die Benzidin-Reaktion taucht bei der kochlabilen Peroxydase sehr stark auf, aber beim kochstabilen, peroxydatisch wirkenden Hämatin äusserst schwach. Das Vorhandensein der Carboxylase und der Glutaminocarboxylase wird zum ersten Mal in meisten Pollenkörnern festgestellt. Verfasser.

94. Ueber den Gaswechsel der Pollen, III. Weitere Untersuchungen über die Dehydrasen aus den Pollenkörnern. Kazuo OKUNUKI. (A.P. **11**, 1939, 65-80, 2 Textfig. und 15 Tab.)

Aus Pollenokörnern wurden drei Dehydrasen: Alkohol-, Glutaminsäure- und Bernsteinsäure-Dehydrase, extrahiert, und deren Eigenschaften näher untersucht. Die Alkohol- und Glutaminsäure-Dehydrase, nicht aber Bernsteinsäure-Dehydrase, beanspruchen zu ihrer Aktivität das Vorhandensein der CO-Zymase und des Flavoproteins. Die Bernsteinsäuredehydrase nimmt den O_2 erst unter Mitwirkung des Cytochromsystems auf, wobei die Geschwindigkeit der O_2-Aufnahme durch Zusatz des Cytochroms c gewissermassen, dagegen durch denjenigen des Redoxfarbstoffes nur ein wenig gesteigert wird. Die Menge des freien Flavins und des Flavoproteins in Pollenkörnern wurde voneinander getrennt bestimmt. Verfasser.

95. Induced polyploidy in some dioecious plants. (Japanese), Tomowo ONO. (J.J.G. **15**, 1939, 319-321, 1 figs.-group).—**Polyploidy and sex determination in *Melandrium*. I. Colchicine-induced polyploids of *Melandrium album*.** (Japanese with English résumé). By the same author. (B.M.T. **53**, 1939, 549-556, 11 text-figs.).

By means of the well-known colchicine method the author has got the polyploids of the following dioecious plants, viz. *Melandrium album* and *rubrum*, *Humulus japonicus*, *Spinacea oleracea*, *Rumex acetosa*, *Acetosella hastatus* and *Asparagus officinalis*. All polyploids have shown various characteristics seen in other cases. Concerning *Melandrium* the author has described the results of his observations somewhat in detail. The chromosome formula of *Melandrium* PMC is represented normally by $24=XY+22a$, that in the tetraploid induced by colchicine treatment by $48=XXYY+44a$. In the I-metaphase of the PMC meiosis the sex-chromosomes X, X, Y, Y either form one tetravalent group with its constituent chromosomes arranged in various ways of conjugation or two groups consisting of two bivalents or one uni- and one trivalent. Further, the author emits the opinion that here Y is longer than X, basing on certain observations.

The crossing between induced polyploids and normal diploids was performed, and the karyological examination of such crosses has revealed the presence of the tri-, tetra- and heteroploid plants.

96. A cytological examination of the decreasing fertility of cultivated rice in Northern Japan. (Japanese with English résumé). Kan-ichi SAKAI. (P.C.S.S.J. **11**, 1939, 40-49, 8 text-figs. and 3 tables).

In Northern Japan the harvest of rice crop in autumn is frequently much lowered on account of the abnormal low temperature in summer. It was shown that the low temperature acts most injuriously in the case when it prevails at the time of the formation of the panicle incipients. The cause of this injury may be explained cytologically, basing on the results of the author's experiments. Potted plants were exposed to 12–13°C during 15–40 hours, and the cytological examination was done on these materials concerning the behaviour of the embryo-sac mother-cell. In normal case each embryo-sac mother-cell forms a tetrad through two successive nuclear and cell divisions, then three upper cells degenerate, and the remaining one develops into the embryo-sac. But under low temperature as above indicated, though four nuclei are formed through two successive nuclear divisions, no cytokinesis takes place, and this four-nucleated macrospore goes to degeneration. Nearly the same degeneration process was seen formerly by the author in pollen mother-cells subjected to low temperature.

Abnormally low temperature in summer occurs in nature at night, so that if the nuclear and cell divisions would occur exclusively during the day time, no lowering of harvest will take place. The author has studied the relative frequency of cytokinesis of pollen and embryo-sac mother-cells during night and day respectively. It was found that in the former the relative frequencies of cytokinesis at day and night is 0.46:0.54, and in the latter 0.54:0.46. Such a frequency of cytokinesis at night will naturally lead to low fertility, if the meiosis will proceed abnormally on account of cold.

97. Beobachtungen über japanische Moosflora XX. (M. deutsch. Zfg.). Kyuichi SAKURAI. (B.M.T. **53**, 1939, 287–291, 327, 7 Textabb.).

Die folgenden neuen Arten sind beschrieben: *Grimmia eurybosis*, DIX. et SAK., *Hyophila liukiunensis* SAK., *Rhynchostegiella caudata* SAK., *Rhynchostegium sulfurothermale* SAK., *Glossadelphus per-corymbifolius* SAK., *Ectropothecium ptilioides* DIX. et SAK.

98. Trivial notes on the Japanese plants (VI). (Japanese with Latin diagnoses). Y. SATAKE. (J. Jap. B. **15**, 1939, 627–632).

The following plants are new species and described, and some new varieties are also contained in this note: *Eriocaulon heleocharioides* SATAKE sp. nov., *E. kuriroense* MIYABE et KUDO, *E. palliscens* (NAKAI) SATAKE sp. nov.

99. Cytogenetic studies on *Tricyrtis*. II. Karyotype analysis in *Tricyrtis* and *Brachycirtis* with special reference to SAT- and nucleolar chromosome. Dyûhei SATÔ. (Cyt. **10**, 1939, 127–157, 35 text-figs.).

The karyological studies were made on two species of *Brachycirtis* and seven species, six varieties and three races of *Tricyrtis*.. The somatic chromosome number is 26 or rarely 25, owing to the fusion of two short chromosomes. As regards the karyotype the chromosome is long or short, satellited either at its proximal or distal end (SAT-chromosome) or not.

The principal part of this paper is concerned with the relation between the chromosomes and nucleoli. In most cases the number of the SAT-chromosomes corresponds to that of nucleoli, thus, for instance, in *Tricyrtis formosana* var. *ramosa* 2 long and 4 short chromosomes bear each one satellite, and 6 nucleoli are present. In other cases the number of nucleoli is greater that of the SAT-chromosomes, for instance, in *Tricyrtis formosana* 1 short chromosome bears the satellite, while the remaining 25 do not bear any, and yet 4 (1 small and 3 large) nucleoli are seen in the prophase.

In this case the satelllited short chromosome becomes attached to the small nucleolus and evidently contributes to its formation. The formation of the remaining 3 nucleoli is due to the action of 3 long chromosomes without any satellite, and each is attached to each nucleolus, whence they are called nucleolar chromosomes.

Furthermore, in *T. perfoliata*, for instance, none of 26 chromosomes does bear the satellite, and yet 4 nucleoli are present. The formation of the latter is evidently due to the action of "nucleolar chromosomes", and each of them is found attached to one nucleolus, their number being 4–10. Nucleolar chromosomes are not apparently different from other chromosomes, and the author cites the opinion of MATSUURA that "every chromosome may be regarded as a nucleolar chromosome in the sense that it can produce nucleoli under certain particular circumstances."

100. East Asiatic lichens. (With Japanese résumé). M. SATÔ. (J. Jap. B. **15,** 1939, 572–578, 2 text-figs.).

Dermatocarpon Tuzibei sp. nov., *D. myogiense* ASAHINA, *Cornicularia odontella* (ACH.) RÖBLING are described.

All Japanese species of *Dermatocarpon* and *Cornicularia* are enumerated with their respective analytical keys for identification.

101. The occurrence of fasciation in flax stem in relation to the environment. (Japanese with English résumé). Tsunetoshi SHIBUYA. (J.S.T.A. **11,** 1939, 227–236, 3 text-figs.-groups).

The experiments were made concerning the fasciation of flax stem as related to certain external conditions.

Firstly, the frequency of the appearance of fasciated stems was found to be far greater when seeds are thinly than closely sown, and the thinner space-planted, the greater the frequency. Secondly, the manuring tends to increase that frequency, and the author could see in one experimental series with no manure no fasciated plants at all. Thirdly, the author has sown seeds every month throughout one year (in Formosa!) and studied, in what case the frequency of fasciated will be highest. It was observed that the seeds sown in August, September and October give rise to the highest number of fasciated stems.

It is clear that the thin sowing, the manuring and the sowing in August-October, in case when the climatic conditions are most favourable for the plant life, will lead to the most vigorous vegetative growth, and consequently to the highest frequency of fasciations.

The comparative anatomical study of normal and fasciated stems has shown that in the fasciated part the number of sclerenchymatous bundles is extraordinarily large, though in respect to their shape as well as the number of cells composing each bundle no special difference is observed between the two.

102. Artificial uncoiling of the chromonema spirals with neutral salt solution. Mitio SIGENAGA. (Jap. J. B. **10,** 1939, 383–386, 1 pl.).

103. Experimental studies of cell-nuclei. Namio SINKE. (M.C.S,, K.I.U. **15,** 1939, 1–126, 8 pls. and 12 text-figs.).

The paper is the extension of the article formerly published by the author concerning the appearance of living nuclei due to hydration or dehydration caused by hypo- or hypertonic solution. (Cf. this JOURNAL **9,** (80), No. 282). He distinguishes in this paper four types of nuclei instead of three, the types I, II and IV corresponding to I, II, III of the former paper respectively. The type III (new) is

the name applied to the homogeneous nucleus, which is shrunken and appears homogeneneous, with the karyolymph strongly dehydrated and having the refractivity approaching that of the chromonemata. The final result of the dehydration of both types I and II is nothing but the type III.

By the action of high temperature the same effect as by that hypertonic solution may be realized. Though in one type the heterogeneous nucleus heated above 60° retains its heterogeneous nature, in another it becomes homogeneous. (Type I and II). The visibility of the chromonemata was shown to depend on the difference in hydration degree between the chromonemata and the matrix and on the consequent difference of their respective refractivity. The nuclear change just referred to is either reversible or not.

Living nuclei were experimentally subjected to the action of abnormal temperature, mechanical injury, acids, alkalies, neutral salts, chloral hydrate and coal tar water extract, and it was ascertained that the nuclei decrease in volume and increase in refractivity, indicating that the dehydration has taken place.

Though the alkali causes the swelling of the nuclei if they are unhealthy (e.g. wounded), it will cause quite contrary effect, i.e. the shrinkage, in healthy nuclei. The latter phenomenon is explained on the basis of the fact that the cytoplasmic vacuoles enlarge through the absorption of water from the surrounding incl. the nucleus and cytoplasm, in other words the whole phenomenon is nothing but that of dehydration of the nuclei.

The action of various external agents just above cited upon the root-tip cells of *Vicia Faba* was followed by the author on the materials which were fixed and stained as usual, and he could observe the pycnosis, i.e. the coalescence of the chromosomes and the formation of giant di-diploid nuclei and binucleate cells. These are caused by the hypertonic saccharose solution which will suggest that the dehydration in the spindle area is the cause of such phenomenon. The irregular scattering of chromosomes in metaphase and anaphase caused by the agents above indicated seems probably to be connected with the hydration in the spindle area. The author thinks that the formation of polyploid cells might be brought about by the dehydration due to various causes.

104. Inducing the flowering and the fruiting of sweet potato by water culture. Tomota SUGAWARA. (Jap. J. B. **10**, 1940, 335–342, 3 text-figs.).

105. Embryological observations on *Thujopsis dolabrata* var. *Hondai* MAKINO. Yosinori SUGIHARA. (Sc. Rpts., T.I.U. **14**, 1939, 291–303, 3 pls. and 6 text-figs.).

In *Thujopsis dolabrata* var. *Hondai* the PMC begins to undergo the meiosis in the middle of February, and then in the metaphase 11 bivalents are recognized. Each mature pollen grain is composed of two cells, viz. pollen-tube cell and antheridial cell. The body-cell contained in the latter forms two sperm-cells of equal size and structure. Though several archesporial cells are developed in one nucellus, one of them differentiates into one megaspore mother-cell, and the remaining to tapetal cells. The latter begin to divide towards December–January, i.e. earlier than the PMC. From each megaspore mother-cell three cells are derived, of which the lowest functions as the megaspore. The female prothallium at first contains free nuclei only. The transversal division of alveolar cells does not occur, until they meet in an axial line of endosperm. The archegonia, 7–9 in number, form a complex at the apex of endosperm. In the mitosis of the central cell 11 chromosomes are seen. After the fertilization, which takes place in early June, the conjugation of male and female nuclei occurs

at the upper part of the archegonium. In the first mitosis after fertilization the spindle takes its origin within the germ-nucleus. The embryo consists of open cells, the prosuspensor, the embryonal tube and the embryo proper.

Several abnormalities were observed.

106. Chromosome numbers in Plumbaginaceae. Toranosuke SUGIURA. (Cyt. **10,** 1939, 73–76, 19 text-figs.).

Formerly the author has counted eight chromosomes in PMC of five species of *Statice.* This time he has further observed 8 ellipsoidal or spherical meiotic chromosomes in *S. bicolor* and *dictyoclada,* 16 V-shaped ones in *S. echioides,* 32 in *S. globuliaefolia,* 8 gemini in *S. Bonduelli.*. Thus the basic number in *Statice* seems to be eight, in contrast to the data of ALESKOWSKY who has found 18 or its multiples in the somatic cells and to those of WULFF, who thinks that the basic number is 9.

In *Armeria* the author has observed already 9, 18 and 27 meiotic chromosomes in PMC of 14 species and 8 only in two species (*A. sardoa* and *pinifolia*). The basic number is thus considered to be 9 in *Armeria.*

According to the serodiagnostic studies of MALLIGSON, the Plumbaginaceae are phylogenetically allied to Primulaceae on one side, and to Aizoa-Nyctaginaceae on the other. It is to be noticed that the basic chromosome number is 9 in the Plumbaginaceae, Primulaceae as well as Aizoa-Nyctaginaceae.

107. Studies in the chromosome numbers in higher plants III. Toranosuke SUGIURA. (Cyt. **10,** 1939, 205–212, 38 text-figs.).

The n-number in 38 species belonging to 22 families of Angiosperms has been counted. The results are shown in tables and figures.

108. Studies on the male gametophyte in Angiosperms VI. Abnormalities in the pollen development of some *Crinum* species. (Japanese with English résumé). Nobuhide SUITA. (J.J.G. **15,** 1939, 209–224, 28 text-figs.).

Five species of *Crinum,* viz. *asiaticum* var. *japonicum, latifolium, gigas, Moorei* and sp. (*Powelli?*) were used as materials of cytological observation. Among these species the first four are apparently genetically homozygotic, and the last of hybrid origin. Concerning the former 4 species the great majority of pollen grains were found to be normal, though a few abnormal ones appeared, such as dwarfs (derived from pentads and hexads), giants (derived from monads), and twins. Their respective rate in *C. asiaticum* var. *japonicum,* for instantce, ist normals 97.572, dwarfs 2.319, giants 0.076, twins 0.033. In *C.* sp. which, as above stated, may be of hybrid origin, abnormalities were abundantly produced, and but few normals were met with; besides certain abnormalities were seen, which do not occur in other species, for instance, ultra-giants, giant twins, 3-4-nucleates. The rate of normals and others was, for instance, 10.699 normals, 80.139 abnormals and dwarfs, 0.012 giants, 0.150 twins, in total 100.00 Basing on the results of the above observations the author concludes that "abnormalities of low frequency in the homozygotic species may be ascribed to an accidental failure of balance among the physical and chemical conditions in a few pollen mother-cells, which has been caused by the interactions of those conditions in the course of meiosis." As regards the abnormalities of high frequency which appears in the case of hybrid species the failure of the chromosome pairing in consequence of hybridity may be its inducing agent, though not exclusively.

109. *Hymenophyllum holochilum* C. CHR. and *H. oligosum* MAK., new to the flora of Taiwan. (Japanese with English résumé). Tokio SUZUKI. (J. Jap. B. **15,** 1939, 472–483, 3 text-figs.).

Though *Hymenophyllum oligosorum* was united with *H. Wrightii* by COPELAND, they are quite distinct, their distinguishing characteristics being enumerated.

110. Spicilegium pteridographiae Asiae Orientalis XIX–XX. (With Japanese résumé). Motozi TAGAWA. (A.PT.G. 8, 1934, 164–176, 229–2367).

The following new species are contained in this article: *Pteris bella, Dryopteris Toyamae, D. taiwanicola, Ctenitopsis subfuscipes, Loxogramme confertifolia.*

111. Untersuchungen über die jahreszeitliche Aenderung des Wasser- und Reservestoffgehaltes der Stengel und Wurzeln von Maulbeerbaum. (Japanisch m. deutsch. Zfg.). Ryohei TAGUCHI. (B.S., F.T.K.I.U. 8, 1939, 350-373).

Der jahreszeitliche Wechsel des Gehaltes an Wasser, den mit verdünnten Säuren hydrolysierbaren Kohlehydraten sowie Rohfetten in Stengel und Wurzel des Maulbeerbaumes wurde makrochemisch untersucht, und zwar besonders mit der Verwendung der KÔKETSUschen Pulvermethode. Danach nimmt der während der Wachstumperiode im Frühjahr ziemlich hohe Wassergehalt allmählich nach dem Frühsommer ab, steigt wieder nach dem Mitsommer empor, um dann das Maximum zu erreichen, wobei das Wachstum des Triebes am lebhaftesten vorgeht, und schliesslich sinkt vom Herbst nach dem Winter ab.

Der Kohlehydratgehalt in den Trieben und Wurzeln steigt während der Vegetationsperiode nach dem Austreiben der Sprosse allmählich an, sinkt im Mitsommer, wobei das stärkste Wachstum stattfindet, um im Spätherbst das Maximum zu erreichen. Der Gehaltwechsel der Fette ist dem der Kohlehydrate ähnlich, ausgenommen die Tatsache, dass die Fettmenge im Verlauf des Winters ansteigt, im Gegensatz zu den Kohlenhydraten, welche zu derselben Zeit zu vermindern pflegen, was besonders deutlich in der Rinde zu beobacten ist. Die Fette werden in der Ruheperiode als der Schutzmittel gegen Kälte oder Trockenheit dienen.

112. On the meiosis of *Rumex acetosa* L. treated with colchicine. (Japanese). Yo TAKENAKA. (J.J.G. 15, 1939, 325).

It is well known that in *Rumex acetosa* there are a number of natural polyploids and aneuploids. The author has studied the effect of colchicine treatment on this plant.

First of all, he has observed the double chromosome number in the archesporial cells of pollen. In I. metaphase and diaphase of PMC no bivalents were present. As regards the chromosome number the polyploidy and aneuploidy of various kinds were seen. Pollen grains were of variable size. Some giant pollen grains were found to contain more than 100 chromosomes, each of which is about half as large as the normal ones. The pairing of X and Y takes place very often, even often than that between 2X.

Pollen grains in this experiment were pretty effective for the fertilization. Seeds were either larger or smaller than the normal ones.

113. Anwendung der Pulvermethode zur Untersuchung über die Veränderung der Verteilung des Stoffgehaltes im Blatt von *Bryophyllum calicinum*. (Japanisch m. deutsch. Zfg.) Torataro TAMAI und Riichiro KÔKETSU. (B.S., F.T., K.I.U. 8, 1938, 121–138, 3 Textabb.)

Wie bekannt bilden die von der Mutterpflanze getrennten Blätter von *Bryophyllum* leicht regenerierende Knospen. Falls solch in Blatt allmählich welkt, pflegt die von den Knospen entfernt liegende Gewebepartie des Mutterblattes zuerst zu verblassen und welk zu werden. Dies ist innerlich von einer Veränderung der Verteilung sowohl des Wasser- als auch des Trockensubstanzgehaltes im Gewebe begleitet, wie es durch eine quantitative Bestimmung nachweisbar ist.

Aber hier ist es dringend nötig, dass man eine rationelle Methode zum Nachweis anwendet, weil sonst ein falsches Ergebnis nicht zu vermeiden ist; und es wurde bei dieser Arbeit nachgewiesen, dass die sog. Pulvermethode einen guten Dienst dabei leistet, während ein rationelles Ergebnis schwer oder nur fehlerhaft mittels anderer üblicher Methoden zu erreichen ist. KÔKETSU.

114. Chromosome studies in Cyperaceae, IV. Chromosome number of *Carex* species. Nobunori TANAKA. (Cyt. **10,** 1939, 51–58, 34 text-figs.).

The *Carex* species are known by the great diversity of their chromosome number. The author has made some new observations on this subject concerning 32 species and 3 varieties, and could find certain chromosome numbers besides those hitherto known, so that these numbers are now known to be 6, 8, 9, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, every number from 23 to 43, 54 and 56.

The karyotypes of certain species were determined, and some aneuploids were found. Artificial species hybrids were obtained, and the author thinks that the hybridization might occur in nature and that this fact may account to some extent for the occurrence of aneuploidy.

115. Chromosome studies in Cyperaceae, VII. Chromosome number and pollen development of *Fimbrystylis.* (With Japanese résumé). Nobunori TANAKA. (B.M.T. **53,** 1939, 480–488, 515–516, 9 text-figs.).

The author has examined the chromosome number of 10 species of *Fimbrystylis* belonging to two subgenera and various sections, and found n=5, 8, 10, 12 and 22. The pollen development was studied in *F. sericea* (n=22). Through two successive nuclear divisions in one PMC 4 nuclei are formed; only one of them survives, and three others which are destined to degeneration are afterwards recognizable as three micronuclei. Only one pollen grain is thus produced from one PMC. Three micronuclei just mentioned seem to have no ability to undergo further division in contrast to what has been observed in *Carex* and *Scirpus*. Furthermore, no clear septum formation takes place between these micronuclei and the pollen nuclei on one hand, and between each of the former on the other. Basing on such facts the author thinks that the genus *Fimbrystylis* is phylogenetically older than the genera *Carex* and *Scirpus*.

The single pollen nucleus undergoes the division and gives rise to vegetative and generative nuclei as usual.

116. *Phytophthora* blight of *Hibiscus Manihot*. (Japanese with English résumé). Heizi TASUGI and Yosio IKEDA. (A.PP.S.J. **9,** 1939, 69–85, 12 text-figs.).

The *Phytophthora* blight of *Hibiscus Manihot*, known here since several years, seems to be caused by *P. parasitica*, as the authors think on the basis of his experiments.

Leaves, roots and stems attacked by this fungus turn at first dull green, produce round patches everywhere, and turn brown at last.

The sporangia produce generally the zoospores, but may germinate directly under high temperature. The chlamydospores are also produced either terminally or intercalarily. Oogonia and amphigynous antheridia are formed; one oospore is formed in each oogonium.

The growth takes place between 6–37°C, and at pH 5.8–6.7. Inoculation is easy to be executed.

117. On the inheritance of color in *Solanum Melongena* LINN. (Japanese with English résumé). Tamio TATEBE. (J.J.G. **15,** 1939, 261–271, 14 tables).

The results of the author's hybridization experiments in the egg-plant are briefly as follows:

Seedling: dark purple color dominant to green and light purple; monogenic segregation.

Fruit: dark purple (violet corolla) dominant to green (white corolla); monogenic segregation. P, the gene for dark purple color. Dark purple×white, F_1 dark purple, F_2 dark purple: violet: green: white=9:3:3:1.

Fruits become dark purple or very lightly so, either only under sunshine in one case, or even in shade (covered by the calyx) in the other. The latter character is dominant to the former, monogenic segregation. The two genes P and D are concerned in this respect. Dark purple in shade (under calyx)×green, digenic segregation.—White×green, F_1 green and monogenic in one case, while in another F_1 fruit dark purple, and the F_2 segregation in trihybrid way.—Flavones are contained in fruits, and C is the gene responsible for this fact.—C,D and P are therefore the three genes which are concerned in the inheritance under discussion.

118. Weitere Untersuchungen über die Polyploidie und geographische Verbreitung bei *Dumortiella hirsuta* I-II. (Japanisch m. deutsch. Zfg.). Seizi TATUNO. (B.M.T. **53,** 1939, 245–250, 405-410, 5 Textabb.).

Früher hat der Verf. inbezug auf die Polyploidie und geographische Verbreitung des Lebermooses *Dumortiella hirsuta* einige Mitteilungen gemacht. (Vgl. diesen JOURNAL **10,** (24), Nr. 95). Die vorliegenden Aufsätze sind die Fortsetzungen davon. Nach den weiteren Beobachtungen des Verfs. kommen die 9-chromosomige Varietät ausschliesslich auf den Kalksteinen im Kalkgebiete vor (Taisyaku in der Prefektur Hirosima und Kusane in der Präfektur Okayama), während die 27-chromosomige Varietät, welche in Japan sehr weit verbreitet ist, niemals im Kalkgebiete aufgefunden wird. Inbezug auf die 18-chromosmige Varietät fehlt die Angabe.

119. On the nature of recreation from *Colocasia antiquorum* var. *esculenta*. (With Japanese résumé). Tadayoshi TAZAKI. (B.T.M. **53,** 1939, 524–533, 2 graphs and 7 tables).

The guttation in *Colocasia antiquorum* is a well known phenomenon. The author has executed the water-culture of the stock of this plant severed from the tuber, and has studied chiefly the relation between the calcium concentration of the recreation (=sap exuded from the leaf-pores) and the nature of the nutrient solution. The latter was chiefly the KNOP solution, besides tap- and distilled water.

When the concentration of the nutrient solution is limited within a certain range (for instance, KNOP solution of ordinary concentration till 1/16) the calcium concentration of the recreation was nearly constant (±3 mg. per 100 cc), but when the concentration of the KNOP solution becomes too high (for instance, 5 times ordinary concentration) the calcium content of the recreation becomes correspondingly high (for instance, nearly 10 mg. per 100 cc), and when tap or distilled water is used as the nutrient medium the calcium content of the recreation becomes lower (for instance, less than 1 mg per 100 cc).

The relation between the concentration of potassium in the nutrient solution and that in the recreation is nearly the same as in the case of calcium, though the content of potassium is always higher than that of calcium.

The volume of the recreation exuded per hour is almost constant within a certain range of KNOP solution, but it diminishes when either the latter is more concentrated than ordinary or is diluted more than ⅛ ordinary concentration.

In plants cultivated in soil the amount of the recreation is much higher than in those in water-culture. The author comes to the conclusion that in the recreation of *Colocasia* the epithem of hydathode will play no active rôle for the salt absorption.

120. The direction of coiling of the chromonema in *Tradescantia*. (Japanese). Tetu TOYOHUKU. (J.J.G. **15**, 1939, 310-312, 3 tables).

Concerning the problem of the directions of coiling of chromonemata in various plants there are different views by various authors. The author of the present article has studied the PMC of *Tradescantia* in this respect. In the PMC under discussion the uni-, bi-, tri- and tetravalents are contained. In some of them all chromonemata of each chromosome are coiled either to left or to right, while in some others each chromosome is composed of the chromonemata coiled in two opposite directions. The ratio of these three modes of coiling is very near to the expected 1:1:2. Furthermore, in the bivalents, either ring- or rod ones, the direction of one chromonema often becomes reversed at the point of insertion on the spindle, i.e. one arm of the chromonema is coiled to left and the other to right. On the contrary, in some bivalents all four arms are coiled exclusively to left, and in some others exclusively to right. So that in this respect there are in all five modes of coiling, viz. 4R, 3R+1L, 2R+2L, 1R+3L, 4L, (R=right, L=left), and the ratio of these five modes was very near to the expected 1:4:6:4:1.

Basing on the observations just mentioned it may be stated that the direction of coiling of the chromonemata takes place according to the law of normal curve.

121. Ueber den Einfluss der Beleuchtungverhältnisse auf das Bewurzeln der Stecklinge grüner Pflanzen. (Japanisch m. deutsch. Zfg.). Seiiti TOYOMURA und Syunzô YOSIOKA. (B.S., F.T., K.I.U. **8**, 1939, 204-230).

Die Wurzelbildung in den Stecklingen von *Chrysanthemum sinense* und *Coleus Blumei* sowie die Knospenbildung an den abgetrennten Blättern von *Bryophyllum calycinum* unter verschiedenen Beleuchtungszuständen wurden untersucht.

Die Regeneration tritt unter dem schwach beleuchteten Zustand viel schneller ein als unter dem stark beleuchteten, weil das Licht dabei eine hemmende Wirkung ausübt. Aber das weitere Verhalten der regenerierten Teile ist dem bisherigen gerade entgegengesetzt, denn das Wachstum der regenerierten Wurzeln und Knospen geht viel schneller unter der starken als der schwachen Beleuchtung, wegen der üppigeren Neubildung der Assimilate im ersteren als im letzteren Fall.

122. On *Santalum boninense* and the distribution of the species of *Santalum*. (Japanese with English résumé). Takasi TUYAMA. (J. Jap. B. **15**, 1939, 697-712, 3 text-figs. and 1 map).

Santalum boninense which has been discovered quite recently in various localities of Titizima in the Bonin Islands is described in detail in this article. The author distinguishes four sections of the genus *Santalum*, viz. Eusantalum (9 species distributed in Lesser Sunda, New Guinea, Australia, Melanesia and the Bonin Islands), Solenantha sec. nov. (4 species restricted to Sandwich Islands), Hawaiensis (4 species, restricted to Sandwich Islands), and Polynesia (3 species, distributed in Southeastern Polynesia). *Santalum boninense* belongs to the Eusantalum like its type *S. album;* and the author states that this fact is rather remarkable, because the Bonin Islands lie far off northwards beyond the range of distribution of Eusantalum.

123. Sukkulenzgrad der pflanzlichen Organe und Pulvermethode. (Japanisch m. deutsch. Zfg.) Kenshi UCHIDA und Riichiro KÔKETSU. (B.S., F.T., K.I.U. **8**, 1938, 61-78).

Trockengewicht, Aschenmenge und Wassermenge pro 1 cm^3 Gewebepulver der 52 verschiedenen Pflanzen-Materialien wurden bestimmt, um die Beziehung zwischen diesen Werten und dem Grad der Sukkulenz zu erkennen.

Nach dem Resultat steht jeder von diesen dreierlei Werten mit dem Sukkulenzgrad in einer merkwürdig parallellaufenden Beziehung. Jedoch weist sich der Wert des Trockengewichtes pro 1 cm^3 Gewebepulver oder der des sog. spezifischen Pulvergewichtes die innigste Beziehung auf.

Die Tatsache, dass der Gehalt des Pflanzenkörpers an der Trockensubstanz den Sukkulenzgrad gut kennzeichnet, beruht aller Wahrscheinlichkeit nach auf dem Grund, dass ein sukkulentes Gewebe stoffreich oder an den wasserspeicherunden Substanzen reich zu sein pflegt. KÔKETSU.

124. Experimentelle Untersuchungen lebender Zellen in Teilung IV. Die Einwirkung des Dampfgemisches von Ammonia und Chloroform auf die Mitose bei *Tradescantia*-Haarzellen. Bungo WADA. (Cyt. **10**, 1939, 158–179, 34 Textfig.).

Der Verf. hat den Einfluss der Einwirkung des Dampfgemisches Ammonia-Chloroform auf die Mitose von lebenden Staubfadenhaarzellen von *Tradescantia reflexa* untersucht. Die Resultate sind wie folgt zusammengefasst.

Das allererste Einwirkungsresultat ist die Quellung der Chromosomen und der Spindelsubstanzen, um bald durch eine Störung der karyokinetischen Vorgänge gefolgt zu werden. In der angequollenen Spindelfigur verwandeln sich die Chromosomen zur Struktur des Ruhekernes und die Spindelsubstanzen zur phragmoplastbildenden Substanz, welche sich neben den Chromosomenklumpen anhäuft und dort hyaline Räume bildet. In der Mitte der letzteren tritt eine Wandanlage auf, welche sich unter der Mitwirkung der Zytoplasmaanhäufung um sie herum und der des Zytoplasmas vom Mutterzellwandbelag aus zur festen Querwand entwickelt.

Unter der Einwirkung des Dampfgemisches kommen daher Syndiploid-, Riesen-, oder Zwergkerne, zweikernige oder kernlose Zellen und vielkernige Zellen mit vielen Räumchen zustande. In der durch das Dampfgemisch hervorgerufenen zweikernigen Zelle verschmelzen die beiden Tochterkerne selten zu einem Syndiploidkern.

125. Die Chromosomenzahl der Süsskartoffel (*Ipomoea Batatas*) und der ihr verwandten Pflanzen, welche in Japan wildwachsend oder kultiviert sind. (Japanisch m. deutsch. Zfg.). Kiyohiko WATANABE. (P.C.S.S. **11**, 1939, 124–134, 1 Textfig.-gruppe).

Vier Kulturrassen von *Ipomoea Batatas* je 2n=90, *I. pes-caprae*, *I. pastigridis*, *I. cairica*, *I. reptans*, *I. obscura*, *I. indica*, *I*, sp., *Operculina Turpethum*, *Hewittia sublobata*, *Calonyction bona-nox*, *C. muribatum*, *Stictocardia campanulata*, *Argyreia nervosa* je 2n=30; *Merremia gemella* 2n=58.

126. Ueber die Blüte der Süsskartoffel (*Ipomoea Batatas*). (Japanisch m. deutsch. Zfg.) Kiyohiko WATANABE. (P.C.S.S.J. **11**, 1939, 135–146, 3 Textfig. gruppen).

Die histologischen Studien der Süsskartoffelblüten haben die folgenden Ergebnisse gegeben:

Das Nuzellusgewebe degeneriert sich frühzeitig, sodass der Embryosack unmittelbar von dem Integument umhüllt wird. Der Embryosack wächst nach seiner mikropylen Seite hin und erweitert dort die Mikropyle, sodass er hauptsächlich an die Stelle der früheren Mikropyle gelagert ist. Der Embryosack ist normal gebaut, und jede Synergide ist am Mikropylende mit einem schmalen Plasma-Fortsatz versehen. Die

Endospermbildung ist nuklear. Bei der Pollenbildung findet die Wandbildung der Tetraden sukzessiv statt, und die Wandverdickung schreitet erst nach der vollendeten Tetradenbildung von der Peripherie aus nach dem Zentrum des Tetrades hin fort. Die Pollenwand ist mit zapfenartigen Exine-Fortsätzen versehen, von denen jeder von vielen feinen Stäbchen-Fortsätzen umgeben ist. Die Austrittstelle des Pollenschlauches ist rund und dünnwandig, und sie ist über die Pollenoberfläche hie und da zerstreut.

127. Biochemische Untersuchungen über die Bakanae-Krankheit der Reispflanzen. Ueber die Krystalle der die Ueberverlängerung der Reissämlinge veranlassenden Substanz, „Gibberellin". (Japanisch). Teizirô YABUTA, Yusuke SUMIKI und Takesi HAYASI. (P.J.S. A.S. **14,** 1937, 609–611).

Die Ueberverlängerungerscheinung der Reissämlinge, welche an der durch *Gibberella Fujikuroi* verursachten Bakanaekrankheit leiden, ist wohl bekannt. Die soeben erwähnte die Ueberverlängerung der Reissämlinge veranlassende Substanz konnten die Verff. aus der Kulturlösung dieses Pilzes isolieren, und zwar durch die Anwendung der aktiven Kohle (Adsorption), nämlich amorphes sog. "grobes Gibberellin" und reineres langsäulenförmiges Krystall, "Gibberellin A" (entweder $C_{12}H_{20}O_3$, oder $C_{18}H_{22}O_3$, noch näher zu untersuchen). Beim Gebrauch der 0,0001% Lösung des groben Gibberellins ist schon eine deutliche Ueberverlängerungsreaktion zu spüren, während das reine Gibberellin etwas schwächer wirkt als das grobe in dieser Hinsicht.

Die Wirkung des Gibberellins ist keineswegs bloss auf Reis beschränkt, sondern erstreckt sie auch auf verschiedene andere Pflanzen, z.B. Buchweizen, Weizen, Gersten, Kohlen, Tomaten, einigen Leguminosen und Cucurbitaceen. In der Kälte und bei saurer Reaktion ist das Gibberellin ganz stabil, doch bei alkalischer labil. Seine characteristische Wirkung wird beim Sieden ganz vernichtet.

Eine merkwürdige Tatsache ist weiter bekannt, dass dieser Pilz ausser der obengenannten Ueberverlängerung veranlassenden Substanz nicht selten noch eine andere ausscheidet, welche der der Ueberverlängerung ganz entgegengesetzte Wirkung ausübt, d.h. die Hemmung des normalen Längenwachstums der Reissämlinge zu einem gewissen Grade. Nun ist es den Verff. gelungen, auch aus der Nährlösung, worin dieser Pilz kultiviert wird, sie rein zu isolieren: plattenförmige farblose Krystalle vom Schmelzpunkt 108–109° und von der chemischen Zusammensetzung $C_{10}H_{13}NO_2$, 4-Butyl-Pyridin-1-Carbonsäure. Ihre Wirkung ist ausserordentlich stark, indem sogar ihre 1/1,000,000 Konzentration eine deutliche Hemmungsreaktion des Längenwachstums hervorzurufen genügt.

128. Untersuchungen über die Peroxydase. Eijiro YAKUSHIJI. (A.P. **11,** 1939, 187–194).

Verfasser untersuchte vergleichend die Peroxydasen aus *Raphanus*-Wurzel, Rohlack von *Rhus succedanea* und Kuhmilch. *Raphanus*-Peroxydase ist spektroskopisch ganz identisch mit der Meerrettich-Peroxydase. Die *Rhus*-Peroxydase besitzt wie die *Raphanus*-Peroxydase, Protohämatin als Wirkgruppe. Reduzierte *Rhus*-Peroxydase zeigt aber ganz andere Absorptionsbanden als *Raphanus*-Peroxydase (α-Band 567 mμ β-Band 537 mμ). Auch zeigt dieses Präparat eine Ascorbinase-Wirkung, aber es ist nicht sicher, ob diese Wirkung der Peroxydase selbst zukommt. Die Milch-Peroxydase ist in bezug auf Reduktionsbanden ähnlich der Peroxydase aus *Raphanus*-Wurzel, aber die Reduktionsbanden in Gegenwart von KCN (570 mμ, 535 mμ) sowie die Pyridinhämochromogenbanden (565 mμ, 532 mμ) weisen deutlich auf die Verschiedenheit dieser beiden Enzyme hin. Wahrscheinlich enthält die Milch-Peroxydase ein neues Hämatin als Wirkgruppe. Verfasser.

129. Ueber die Nitratereduktase und die „Nitritreduktase", ein neues Enzym, von *Bacillus pyoceanus*. Untersuchungen über die biologischen Reduktionen, II. Syunzi YAMAGATA. (A.P. **11**, 1939, 145–157, 3 Fig.).

Im Anschluss an seine frühere Arbeit über die Nitratreduktase von *Bac. coli* (Acta Phytochim., **10** (1938), 283) hat sich der Verfasser diesmal mit der Frage der Nitratreduktion von *Bacillus pyocyaneus* beschäftigt. Aus den Bakterienzellen wurde zunächst die Nitratreduktase zellfrei extrahiert, welche ebenso wie diejenige von *Bac. coli* durch Koppelung entweder mit Dehydrasesystem (Alkoholdehydrase aus Rübe) oder mit Kojisäure-Methylenblau-System die Reduktion des Nitrates zum Nitrit bewirkt. Cyanid und Urethan hemmen die Wirkung dieses Enzyms beträchtlich. Das wichtigste Ergebnis von dieser Arbeit liegt aber darin, dass in der aus *Pyocyaneus* extrahierten Enzymlösung ausser Nitratreduktase ein anderes, früher in *Bac. coli* nicht nachgewiesenes Enzym aufgefunden werden konnte, welches nämlich ebenso unter Koppelung mit Dehydrasesystem sowie mit Kojisäure-Methylenblau-System auf Nitrit reduzierend wirkt. Die Wirkung dieses neuen Enzyms, der ,,Nitritreduktase" wie der Verfasser es nennt, wird auch durch Cyanid beeinträchtigt, jedoch ist dessen Empfindlichkeit bei weitem geringer als die der Nitratreduktase. Als primäres Reduktionsprodukt aus Nitrit hat der Verfasser entweder Dioxyammoniak oder Hyponitrit vermutet; die Entscheidung darüber hoffte der Verfasser an einer späteren Gelegenheit treffen zu können. Sehr bedauerlich ist, dass der Verfasser, ohne dieses aussichtsreiche Arbeit weiter fortsetzen zu können, bald nach der Veröffentlichung dieses Aufsatzes aus seinem dreissigjährigen Leben schied. H. TAMIYA.

130. Ueber die Vererbung der anomalen Blütenform "Tomoe" bei *Portulaca grandiflora*. (Japanisch). Yasuke YAMAGUTI. (J.J.G. **15**, 1939, 357–358, 1 Textabb.).

Im Jahre 1933 hat der Verf. aus einer normalen Sippe von *Portulaca grandiflora* 5 Stöcke bekommen, die durch eine eigentümliche Kronengestalt ausgezeichnet sind, nämlich sog. "Tomoezaki" in japanisch. Die Eigentümlichkeit derselbe bei dieser experimentell als homozygotisch bewiesenen Sippe besteht darin, dass die eine Seite jedes Kronenblattes nach aussen und die entgegengesetzte nach innen eingerollt sind. Die F_1-Pflanzen zwischen solchen und normalen Sippen sind normal und die F_2-Spaltung geschieht nach 3:1 Schema.

Die Experimente von Farbmerkmalen von solchen Pflanzen wurden zugleich ausgeführt.

131. Ueber die Wirkung des Saponins auf die *Spirogyra*-Zellen.. G. YAMAHA und Z. ARAKI. (Sc. Rpts., T.BR.D. No. **71**, 1939. 129–138).

Die Zellen von gewissen *Spirogyra*arten wurden mit 0,5–1,0% Lösung des wegen seiner wirksamen hämolysierenden Tätigkeit bekannten Saponins vorbehandelt und dann im 5–50% Methylalkohol eingelegt. Die vergleichenden Studien solcher Zellen und der Kontrolle-Zellen (d.h. Zellen ohne Saponinvorbehandlung) beweisen, dass bei den ersteren die Empfindlichkeit gegenüber Methylalkohol viel höher ist als bei den letzteren. Ganz dasselbe Resultat bekommt man bei dem plasmolytischen Verfahren z.B. mittelst $Ca(NC_3)_2$ oder KNO_3, indem bei den mit Saponin vorbehandeltenen Zellen der Plasmolyseverlauf deutlich beschleunigt wird im Vergleich zu der Kontrolle. Weiter, die Experimente der Vitalfärbung durch gewisse Farbstoffe, z.B. Neutralrot, Eosin oder Rhodamin B beweisen, dass die Saponinvorbehandlung immer die Färbung begünstigt. Die Resultate bei den obigen genannten verschiedenen Experimenten lehren uns, dass parallel zu der Beobachtung BOAS' über Hefezellen und derselben SIEGFRIGS über *Elodea*zellen das Saponin als ein bedeutsamer Steiger der Protoplasmapermea-

bilität im Sinne von MUNTHIU wirkt. Auch die Viskosität des Protoplasmas wird durch Saponin vermindert, wie von den Verff. durch Zentrifugierenversuche gezeigt worden ist. Und diese Viskositätverminderung des Protoplasmas mag die Verkürzung der Plasmolysezeit erklären, indem sie mitsamt der Adhäsion der Plasmahaut an die Zellmembran durch Saponin sich vermindert.

Die Frage, ob das Saponin bloss in der Oberfläche des Protoplasmas eingreift oder tief in sein Innere eindringt, wird von den Verff. im letzteren Sinne beantwortet: die Verflüssigung des ganzen Protoplasmas durch Saponin, wie aus den Zentrifugierenversuch sowie aus den ultramikroskopischen Bildern hervorgeht, sprechen dafür.

Die weitere Frage, ob die höhere Widerstandsfähigkeit der pflanzlichen Zellen im Vergleich zu den tierischen zum Vorhandensein der Zellmembran bei den ersteren zuzuschreiben sei, wird von den Verff. im negativen Sinne beantwortet, indem z.B. die nackten Protoplasmakörper, wie die Schwärmer der Myxomyzeten, ebenso widerstandsfähig gegenüber der Saponinwirkung wie die *Spirogyra*zellen. Die hohe Empfindlichkeit der Erythrozyten in dieser Hinsicht ist an ihrem eigenen Charakter begründet, nicht aber auf ihre Nacktheit.

132. Ueber die Wirkung einiger oberflächenaktiver Substanzen auf die *Spirogyra*-Zellen. (Japanisch). Gihei YAMAHA, Zirô ARAKI und Rikizô UEDA. (**B.Z. 7, 1939, 1673–1830**).

Der Inhalt des vorliegenden Aufsatzes ist demselben des vorigen Nrs. (131) ähnlich. Obgleich die Angaben über die Wirkung des Saponins auf die *Spirogyra*zellen ganz dieselben sind wie im Nr. 131, enthalten der vorliegengende Aufsatz die Experimentresultate über die Wirkung von oleisaurem und gallensaurem Natron sowie Seifenwasser, welche ebenso oberflächenaktiv sind wie das Saponin.

Mittels des dem im vorigen Nr. beschriebenen gleichartigen Verfahrens konnten die Verff. sich von der Tatsache überzeugen, dass alle obengenannte Substanzen die Viskosität des Zytoplasmas erniedrigen und auch die Permeabilität desselben gegen die Farbstoffe erhöhen (Vitalfärbung).

Die erniedrigende Wirkung der Zytoplasmaviskosität stehen ihrem respektiven Grade nach wie folgt: oleinsaures Natron>gallensaures Natron>Saponin>destilliertes Wasser.

Inbezug auf die Vitalfärbung, d. h. erhöhende Wirkung der Zytoplasmapermeabilität stehen die folgenden Substanzen ihrem respektiven Grade nach wie folgt: oleinsaures Natrom>Seifenwasser>gallensaures Natron>Saponin.

Die allgemeinen Schlüsse der Verff. sind wie folgt: die oberflächenaktiven Substanzen werden in der Zytoplasmamembran leicht adsorbiert und wahrscheinlich dringen ins Innere derselben hinein (Intrapermeabilität). Solche Eigentümlichkeit wird nicht an der Natur der betreffenden Substanzen begründet, sondern lediglich von der Grösse ihrer respektiven Oberflächenspannung abhängig sein.

133. Materials for a flora of the Southern Asia, including Formosa, Ryûkyû, South China, Malay Archipelago and others. I. (With Japanese résumé). Yoshimatsu YAMAMOTO. (**J.S.T.A. 11, 1939, 275–281, 2 text-figs.**).

The following plants are enumerated, the literatur, synonyms, habit, distribution, etc. being given: *Areca Catechu* L., var. *silvatica*, BECC., var. *subglobosa* YAMAMOTO var. nov., var. *longicarpa* BECC., var. *cylindrica* YAMAMOTO var. nov. var. *parvior* YAMAMOTO var. nov., *Setaria lutescens* (WEIGEL) HUBBARD, var. *flava* (BACKER) YAMAMOTO comb. nov., *Stephania cephalantha* HAYATA, *Smilax China* L. var. *Kuru*

SAKAGUCHI, *Dioscorea Matsudai* HAYATA, *Plantago major* L. var. *asiatica* DECNE, form. *amamiana* YAMAMOTO form. nov.

134. Varietal hybrids in Japanese sake yeast. (Japanese). Yukio YAMAMOTO. (J.J.G. **15**, 1939, 353-355, 2 text-figs. and 5 tables).

The hybridization between the two strains of Japanese saké yeast, viz. Nada No. 1 and Takinogawa No. 6 was done. In conjugation the two processes, each of which protrudes out from each individual (haploid) meet and fuse together, just as in *Zygosacchromyces*, and the zygote is produced.

When the two parents as well as F_1 offspring are compared in various respects, it will be clearly seen that the heterosis due to hybridization is conspicuous here just as in higher plants and animals. Thus, for instance, giant colonies formed by means of malt-culture: 16.8, 15.5 and 19.8 mm (average diameter) in Nada, Takinogawa and F_1 respectively. Further, dry weight: 49.5, 50.1 and 70.1 mg. in the three strains respectively. The quantity of CO_2 evolved by the fermention activity is smallest in Takinogawa, somewhat larger in Nada, and far larger in F_1; the quantity of sugar consumed by the three strains during 9 days is 60.71, 72.97 and 82.97% respectively.

135. Genetical investigations on Saccharomycetes I. Segregations in *Saccharomyces Sake* YABE. (Japanese with English résumé). Yukio YAMAMOTO. (B.M.T. **53**, 1939, 449-459, 10 text-figs.).

Concerning the two varieties of Japanese saké yeast (*Saccharomyces Saké* YABE), called Takinogawa No. 6 and Nada No. 1 respectively the spores contained in each ascus were isolated one by one by using the micromanipulator and cultured separately. It was found that all of them except one have germinated without pairwise conjugation, forming haploid cells of round shape. One single exception is elongated and this is evidently due to the pairwise conjugation of sister cells, and consequently is diploid. The difference of these two kinds of cells may be seen from the fact that when they are placed on plaster block and GORODOWA agar, the round haploid cells do not form spores, while the elongated diploid ones do.

The culture of isolated spores from an ascus on beerwort gelatine or agar leads to the development of giant colonies. In the case of Nada No. 1 all such colonies agree perfectly in their morphological characters, while in that of Takinogawa No. 6 they differ not only in this respect, but also in their intensity of fermentation as well as their dry weight. So that it is clear that in the former no genetic segregation takes place, while in the latter it does. Consequently the former is a homozygotic and the latter a heterozygotic individual.

The segregation was seen again in the second generation of Takinogawa No. 6, which was produced through the conjugation of two sister cells of the first generation.

According to the author the yeast Takinogawa No. 6 is probably an autopolyploid, e.g. AAaa with haploid cell Aa.

136. Zellsaftkonzentration und Widerstandsfähigkeit gegen *Aphis gossypii* beim Zuckerrohr. (Japanisch). Morimasa YAMASAKI und Hiroki ARIKADO. (P.J.S.A.S. **14**, 1939, 153-155).

Die experimentellen Untersuchungen von beiden Verff. haben ihnen zum Schlusse geführt,, dass die Konzentration des Zellsaftes zur Widerstandsfähigkeit gegen den Angriff von *Aphis gossypii* im umgekehrten Verhältnis steht, d. h. je dünner der Zellsaft, desto grösser die Widerstandsfähigkeit sein wird. Nach der Messung von Verff. mit dem Handrefraktometer konnten sie sich von der Tatsache überzeugen, dass

10 Sippen mit hoher Zellsatkonzentration (im Mittel 5,9 Brix) weniger widerstandsfähig sind als 10 anderen mit niederer Konzentration (im Mittel 4,5 Brix). Es ist wohl bekannt, dass der Regenfall zu einem gewissen Grade die Vermehrung von *Aphis* hemmt. Dabetreffend ist es im allgemeinen angenommen, dass es davon herrührt, dass die Insekten durch den Regen ausgewaschen werden, doch nach der Ansicht Verffs. muss in dieser Hinsicht die Erniederung der Zellsaftkonzentration durch das Regenwasser in Erwägung gezogen werden.

137. Polyploidy and the size of stomata in the sugar-cane. (Japanese). M. YAMASAKI and A. MORIYA. (B.Z. **7,** 1939, 1069-1072, 1 textfigs.-group).

It is well known that the stomata are very often larger in the auto- as well as the allopolyploids than in their respective diploid parents. In sugar-cane hybrids it is the same. Thus, for instance, the strain 2364JOP has n=74, while its two parents have n=68 and $\frac{88-89}{2}$ respectively. The length of each stoma in the hybrid strain just mentioned measures 47.99 μ (average), while in the two parents it measures 40.51 μ and 35.53 μ respectively. In sugar-cane it is very difficult to distinguish between the diploids and the allopolyploids according to their external feature, but the comparison of stomatal length will make this distinction quite easy.

138. An experiment concerning the problem of seed setting by means of budpoll nation in self-incompatible *Petunia violacea*. Sadao YASUDA. (P.I.A. **15,** 1939, 359-361).

It is well known that *Petunia violacea* which is perfectly sterile by self-pollination (self-incompatible) will set seeds when its flowers are fertilized in their bud stage by their own pollen. There are several explanations for this phenomenon. One of them is that in this case the fertilization is successful, because in the bud stage the style, i.e. the route through which the pollen-tube will traverse to attain the ovule, is yet short. The author's experiment described in this paper will indicate clearly that this explanation is not at all correct. His mode of experimental procedure was as follows: He has cut off the upper portion of the style in mature flower, the remaining lower portion (below called a) being much shorter than that which has been cut off. The latter was again separated into two parts, the upper with the stigma and the lower without it. The part with the stigma was connected to the portion (a) by a short glass-tube (lower part out of use). Thus the style was artificially much shortened. In respect to such flowers with shortened style the self-pollination as well as the pollination by other strains were done. Such pollination experiments have shown that while in the latter case the fruit setting has taken place, no single fruit has been obtained in the former. Thus that the mere fact of the shortness of the style will not induce the fruit setting has been proven. The author thinks that only the hypothesis formerly proposed by him will be able to explain the phenomenon under question, i.e. that the lack of the special inhibiting substance in the pistil in bud stage is the chief cause of the success of bud-pollination.

139. Parthenocarpy induced by stimulation of pollination in some higher plants. Sadao YASUDA. (M.F.S.A., T.I.U. **27,** 1939, 1-51, 4 pls., 6 text-figs., 33 tables).

This paper is a collective review of the result of the author's experiments executed since ten years and published in various places. (Cf e.g. this JOURNAL **7,** (28), No. 104 and (67), No. 237.

140. On dominant lethal gene (L) causing partial sterility in *Hosta pluntaginea* ASCHERS. and on a hybrid of *H. plantaginea* and *h. plantaginea* var. *japonica* KIKUCHI et F. MAEKAWA. (Japanese with English résumé). Kono YASUI. (J.J.G. **15**, 1939, 294–296, 1 text-fig. and 2 tables).

The self-pollination of *Hosta plantaginea* ASCHERS. has produced the capsules containing good and aborted ovules in the ratio of 1:3 respectively. On the contrary, the hybridization of this plant by *H. plantaginea* var. *japonica* has given rise to these two kinds of capsules in the ratio 1:1.

Basing on such results, the following conclusions have been reached. *H. plantaginea* is a heterozygote Ll, where L is a dominant lethal gene and l its allele. The self-pollination of Ll gives rise to LL+2Ll+ll, in which the capsules of ll plant bears good seeds, and that of LL+2Ll only aborted seeds. The hybridization Ll×ll (=*H. plantaginea* var. *japonica*) =Ll+ll, i.e. the two kinds of capsules in the ratio 1:1.

141. Karyological studies on *Iris japonica* THUNB. and its allies. Kono YASUI. (Cyt. **10**, 1939, 180–188, 8 text-figs.).

The results of the karyological studies of the present writer differ from those of KAZAO and SIMONET. In the meiosis of pollen- and embryo-sac mother-cells 54 chromosomes are counted. Among them there are besides a few (2–5) trivalents the univalents, numbering about one-third of the whole and the remaining 14 pairs making the bivalents. On the basis of such observations the writer thinks that *Iris japonica* is not an autotriploid (as announced by KAZAO), but an allotriploid derived from a hybrid between two species having different karyotypes, in which the chromosome set of the one species has been doubled, so that the karyotype of this hybrid may be denoted as AAB. The karyological examination of the root-tip cells will confirm this conclusion, inasmuch as their chromosomes can be classified into three sets, of which the two much resemble to each other (AA) and the third is of quite different type (B).

A diploid Chinese species (2n=36) allied to *I. japonica* and *I. formosana* (diploid, 2n=28) was further karyologically studied, and it was observed that the karyotype of each of them is different from that of *I. japonica*.

I. japonica and its allied species show an aneuploid series, 2n=28, 34, 36, and an allotriploid 2n=54. The presence of such aneuploidy is to be ascribed to the power of the vegetative propagation proper to this species, because if the propagation had taken place exclusively by seeds, aberrant chromosomes might have been eliminated during the meiosis, and the aneuploids would have returned soon to the euploid condition.

142. A note on the refractive granules in the microspore mother-cell and the microspore of *Tradescantia*. (With Japanese résumé). Kono YASUI and Nobuhide SUITA. (B.M.T. **53**, 1939, 521–524, 1 pl.).

The refractive granules in the PMC of many higher plants were shown to be of lipoid nature. But that in the case of *Tradescantia* (*reflexa*) they are starch granules, has been known to Japanese botanists long since. Very recently, however, some American authors have denied the starch nature of refractive granules in *Tradescantia* because they could not observe the characteristic starch reaction towards iodine and iodine potassium solution. Nor could some of them recognize the double refraction of these granules under polarized light.

The authors of the present article have repeated the experiments of the American investigators, and contrary to their observations, they could confirm the starch nature of the refractive granules: the iodine and the iodine potassium reaction as well as

the double refraction under crossed Nichols were seen positively. The granules were proven, not to be of lipoid nature and to have greater specific gravity than the cytoplasm.

The refractive granules under question are therefore primarily of starch nature, and they may be the amyloplasts containing starch grains.

143. Studies on the thermal algae of Hokkaidô (2). (Japanese with English résumé). Y. YONEDA. (A.PT.G. 8, 1939, 148–163).

The author has studied the thermal algae living in several hot springs of Hokkaidô, chiefly those in the province Osima (in Southern Hokkaidô). They belong either to the Cyanophyceae or Diatomaceae.

Cyanophyceae: *Oscillatoria, Synechococcus, Phormidium, Chroococcus, Microcoleus, Gloeocapsa, Spirulina, Lyngbya, Schizothrix, Mastigocladus.*

Diatomaceae: *Cymbella, Surirella, Pinnularia, Ceratoneis, Nitzschia.*

Among the Cyanophyceae above mentioned the genus *Oscillatoria* is represented by a great number of species.

144. On the spore formation within the culture solution in some *Aspergilli*. (Japanese with English résumé). Fuji YOSHIMURA. (B.M.T. **53**, 1939, 309–317, 12 text-figs.).

In the culture of *Aspergillus flavus* and *A. tamari*, when the amount of glucose as the carbon source is reduced or any one of the nitrogen, phosphorus and sulphur source is eliminated, the spore formation will take place, while in *A. oryzae* this is not the case, except only when the amount of glucose is reduced. In contrast to what is mentioned above, the elimination of potassium or magnesium will not induce the spore formation in the culture solution.

The state of the developed submerged spore corresponds to that of the unripe aerial conidia. The formation of the typical verrucrose surface, which is proper for these fungi, cannot be completed in the case of submerged spore.

Heavy metals, such as iron, zinc, copper and manganese are not directly concerned in the formation of submerged spore, while copper in a relatively high concentration hinders its formation, especially in the absence of manganese.

Either too high or too low pH is unfavourable for the formation of submerged spore.

In *A. tamari* it is often observed that the spores are formed within submerged as well as aerial mycelium. The endospore of the type is to be regarded as a modified form of the ordinary spore and no special meaning may be attributed to it.

145. Ecological studies of "Nemagaritake" (dwarf bamboo). (Japanese with English résumé). Kunizi YOSIOKA. (E.R. **5**. 1939, 117–130, 185–202, 304–312, 15 text-figs.).

"Nemagaritake" is the Japanese name applied to dwarf bamboo growing in mountainous region of Northern Japan. It is represented by *Sasa kurilensis*, its variety *genuina*, and *S. paniculata*. *S. kurilensis* is most widely distributed, while *S. paniculata* is restricted to the Fagetum, and var. *genuina* to the lower part of the Abietinum.

Though the lower limit of "Nemagaritake" is obscure on account of human interference, its upper limit coincides with the timber limit of *Abies* (1400 m). It either grows in the undergrowth of forests or forms pure association in the place where snow is so deep as forests are unable to establish themselves. Its productivity is highest at the altitude 1100–1300 m, decreases upwards and downwards. Its density increases parallel to the altitude, while the individual growth, such as the diameter and height

of culm, the development of leaves is good at the lower place. It is not found on peat moor. In the case of deep soil the range of its growth is within pH 3.0–6.2, moisture 20–300%. In invading new lands *S. paniculata* and *kurilensis* var. *genuina* take the lead, but later are dominated by *S. kurilensis*. They propagate almost exclusively in vegetative way. Though they flower in summer, no seedlings were observed as a rule. They seem to live 10–12 years in the open land, but only 5–9 years in shade.

146. Studies in the cytology of Pteridophyta XVIII. The structure of the chloroplast of some Pteridophytic plants. Akira YUASA. (Jap. J. B, **10**, 1940, 465–475, 7 text-figs.).

ERRATA

Vol. XI, No. 1, S. (1), L. 1: *lies* Sporangium *statt* Sporogonium

,, ,, ,, ,, S. (12), L. 14 von unten: *lies* bei *statt* bel

,, ,, ,, ,, S. (24), L. 19 von unten: *lies* Studien *statt* Studies